

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 14/54

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98808134.2

[43]公开日 2000年9月20日

[11]公开号 CN 1267307A

[22]申请日 1998.8.13 [21]申请号 98808134.2

[30]优先权

[32]1997.8.14 [33]IL [31]121554

[32]1997.8.27 [33]IL [31]121639

[32]1997.9.29 [33]IL [31]121860

[32]1997.11.6 [33]IL [31]122134

[32]1998.7.22 [33]IL [31]125463

[86]国际申请 PCT/IL98/00379 1998.8.13

[87]国际公布 WO99/09063 英 1999.2.25

[85]进入国家阶段日期 2000.2.13

[71]申请人 耶达研究发展有限公司

地址 以色列雷霍沃特市

[72]发明人 达妮埃拉·诺维克 查尔斯·迪纳雷罗

梅纳赫姆·鲁宾斯坦 金修铉

[74]专利代理机构 北京三幸商标专利事务所

代理人 刘激扬

权利要求书 4 页 说明书 69 页 附图页数 26 页

[54]发明名称 白细胞介素-18 结合蛋白质及其制备和用途

[57]摘要

提供了能够结合 IL-18 和/或调节和/或封闭 IL-18 的活性的白细胞介素-18 结合蛋白质。也提供了它们分离和重组产生的方法,编码它们的 DNA,表达它们的 DNA 载体,用于在人和其它哺乳动物中表达它们的载体,抗它们的抗体。

ISSN 1008-4274

## 权利要求书

---

1. 包括 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列, 突变蛋白, 融合蛋白质, 功能衍生物, 活性部分, 环变化衍生物及其混合物的 IL-18 结合蛋白质(IL-18BP)。

2. 根据权利要求 1 所述的 IL-18BP, 至少具有下面的功能之一:

- (i) 结合 IL-18,
- (ii) 调节 IL-18 的活性,
- (iii) 封闭 IL-18 的活性。

3. 选自包括下面物质的基团的 IL-18BP:

(a) 含有 SEQ ID NO:2, 4, 6 或 8 的氨基酸序列的任何一  
个的多肽;

(b) 如(a)中确定没有引导序列的多肽;

(c) 如(a)或(b)中定义的多肽的突变蛋白, 融合蛋白质, 功能  
衍生物, 活性部分, 环变化衍生物及其混合物; 和

(d) 如(a)或(b)中定义的多肽的病毒同系物。

4. 根据权利要求 3 所述的 IL-18BP, 至少具有下面的一个生物特性:

- (i) 结合 IL-18,
- (ii) 调节 IL-18 的活性,
- (iii) 封闭 IL-18 的活性。

5. 根据权利要求 1~4 中的任一项所述的 IL-18BP 是非病毒蛋白质。

6. 根据权利要求 5 所述的 IL-18BP, 是人蛋白质。
7. 根据权利要求 1~6 中任一项所述的 IL-18BP, 具有约 40 千道尔顿的分子量。
8. 根据权利要求 1~7 中任一项所述的 IL-18BP, 是融合蛋白质。
9. 包括根据权利要求 1~8 中任一项所述的 IL-18BP 的蛋白质。
10. 根据权利要求 1~9 中任一项所述的 IL-18BP 的可溶性形式。
11. 根据权利要求 1~10 中任一项所述的 IL-18BP, 是非糖基化 IL-18BP。
12. 在严格条件下, 能够或在严格条件下但由于遗传密码的简并性至少与 SEQ ID NO:1, 3, 5 或 7 的一个 DNA 序列杂交的 DNA, 所述的 DNA 能够编码权利要求 1~11 中任一项所述的 IL-18BP。
13. 编码根据权利要求 1~11 中任一项所述的 IL-18BP 的 DNA, 包括 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列。
14. 编码根据权利要求 1~11 中任一项所述的 IL-18BP 的 DNA, 包括在 3' 末端提供终止密码子的氨基酸序列 SEQ ID NO:10。
15. 在严格条件下与权利要求 13 所述的 DNA 杂交或由于遗传密码的简并性在严格条件下杂交的 DNA, 能够编码根据权利要求 1~11 中所述的任一项 IL-18BP。
16. 根据权利要求 12~15 中任一项所述的 DNA 可操作地连接简化表达的其它 DNA 序列, 如启动子, 增强子等。

17. 根据权利要求 12~16 中任一项所述的 DNA 是基因组 DNA。

18. 根据权利要求 12~17 中任一项所述的 DNA, 是 cDNA。

19. 根据权利要求 18 所述的 cDNA, 包括选自 SEQ ID NO:1, 3, 5 和 7 的 DNA 序列的基团的 cDNA 序列。

20. 根据权利要求 18 或 19 所述的 cDNA, 适于在细菌宿主中表达。

21. 包括根据权利要求 12~20 中任一项所述的 DNA 的可复制表达载体。

22. 含有根据权利要求 21 所述的表达载体的转化宿主细胞。

23. 根据权利要求 22 所述的转化宿主细胞是真核生物细胞。

24. 根据权利要求 22 所述的转化宿主细胞是原核细胞。

25. 根据权利要求 1~11 中任一项所述的 IL-18BP 的生产的过程, 包括在适于表达所述的 IL-18BP 和分离所述的 IL-18BP 的条件下培养根据权利要求 21~23 中任一项所述的宿主细胞。

26. 根据权利要求 1~11 中任一项所述的 IL-18BP 的抗体。

27. 根据权利要求 26 所述的抗体是多克隆抗体。

28. 根据权利要求 26 所述的抗体是单克隆抗体。

29. 根据权利要求 26 所述的抗体是抗独特型抗体。

30. 根据权利要求 26 所述的抗体是嵌合抗体。

31. 根据权利要求 26 所述的抗体是人化抗体。

32. 根据权利要求 3 所述 IL-18BP 的分离的方法, 包括:

(a) 将人液体通过偶联 IL-18 的层析柱,

(b) 洗脱能够结合 IL-18 的蛋白质, 和

(c)纯化所述的蛋白质。

33. 含有根据权利要求 1~11 中任一项所述的 IL-18BP 的药物组合物。

34. 含有根据权利要求 1~11 中任一项所述的 IL-18BP 的病毒编码同系物的药物组合物。

35. 含有编码根据权利要求 1~11 中任一项所述 IL-18BP 的 DNA 的药物组合物。

36. 在药物组合物的制剂中根据权利要求 1~11 中任一项所述的 IL-18BP 的用途, 用于治疗需要给药 IL-18BP 的病症。

37. 在药物组合物制剂中编码根据权利要求 1~11 中任一项所述的 IL-18BP 病毒编码的同系物的用途, 用于治疗需要给药 IL-18BP 的病症。

38. 根据权利要求 1~11 中任一项所述的 IL-18BP 用于纯化 IL-18。

39. 根据权利要求 26~31 中任一项所述的抗体用于对 IL-18BP 的检测。

40. 编码根据权利要求 1~11 中任一项所述的 IL-18BP 或所述的 IL-18BP 的病毒编码的同系物的 DNA 用于基因治疗。

41. 根据权利要求 12~20 中任一项所述的 DNA 用于制造根据权利要求 1~11 中任一项所述的 IL-18BP。

# 说明书

## 白细胞介素-18结合蛋白质及其制备和用途

### 发明领域

本发明涉及能够结合 IL-18 的白细胞介素-18(IL-18)结合蛋白质,以下简称 IL-18BP。这一发明涉及从体液中获得的可溶性 IL-18BP,涉及宿主细胞中通过适当的 DNA 载体表达得到的可溶性 IL-18BP,涉及宿主细胞中通过适当 DNA 载体表达可得的 IL-18BP 的病毒编码的同系物,涉及用于在人和其它哺乳动物中表达 IL-18BP 的载体,涉及抗 IL-18BP 的抗体,涉及所述的 IL-18BP 通过调节和/或封闭 IL-18 活性的治疗用途,涉及所述的表达载体在调节和/或封闭 IL-18 活性中的治疗用途和涉及抗体的用途。

### 发明背景

在 1989 年,公开了从小鼠脾细胞中获得的诱导干扰素  $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )的外毒素诱导的血清活性(27)。这一血清活性的功能不是 IFN- $\gamma$  的直接诱导物而是与 IL-2 或促分裂原一起的共同刺激物。从外毒素处理后的对小鼠的血清活性的纯化尝试表明显然同源的 50~55 千道尔顿(kDa)蛋白质(26)。因为其它细胞因子可以作为 IFN- $\gamma$  产生的共刺激物,IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 或 TNF 的中和抗体中及血清活性的失败表明它是不同的因子。在 1995 年,同样这些科学家证明 IFN- $\gamma$  产生的外毒素

诱导的共刺激物存在于利用 P.acnes(31)预处理的小鼠的肝提取物。在这一实例中,肝巨嗜细胞群体(Kupffer 细胞)扩展并且在这些小鼠中,在非预处理小鼠中非致命的低剂量细菌脂多糖(LPS)变成致命的。从 1,200 克 P.acnes 处理的小鼠肝将命名为 IFN- $\gamma$  诱导的因子(IGIF)和后来命名为白细胞介素-18(IL-18)纯化成分浆物。利用起源于纯化的 IL-18 的氨基酸序列的简并寡核苷酸克隆小鼠 IL-18 cDNA(31)。IL-18 是 157 个氨基酸的 18~19 千道尔顿蛋白质,它与数据库中的任何肽没有明显的相似性。在 Kupffer 细胞和活化的巨嗜细胞中是容易检测到 IL-18 和白细胞介素-12(IL-12)的信使 RNA。重组 IL-18 显然通过独立的途径比 IL-12 更具潜力地诱导 IFN- $\gamma$ (31)。与外毒素诱导的血清活性相似,IL-18 本身不诱导 IFN- $\gamma$ ,但初级功能是与促分裂原或 IL-2 一起作为共刺激物。IL-18 显然通过 IL-2 独立途径增强 T 细胞增殖,并且增强 Th1 细胞因子的体外产生并且当将 IL-12 与增强的 IFN- $\gamma$  产生结合时显示了协同作用(24)。

小鼠 IL-18 的中和抗体显示了能够在 P.acnes 预处理的小鼠中预防低剂量 LPS 的致死。在预处理的小鼠中其它人已经报道了 IFN- $\gamma$  作为 LPS 致死的介导物的重要性。例如,中和抗 IFN- $\gamma$  抗体保护小鼠不会 Shwartzman 状休克(16),并且 IFN- $\gamma$  受体缺陷的半乳糖胺处理的小鼠是抗 LPS 诱导的死亡的(7)。所以,不能预期小鼠 IL-18 的中和抗体保护 P.acnes 预处理小鼠抵抗致死 LPS(31)。抗小鼠 IL-18 处理也保护生存的小鼠抵抗严重的肝细胞毒性。

在克隆小鼠形成后,在 1996 年报道了 IL-18 的人 cDNA

序列(38)。重组的人 IL - 18 显示了天然的 IL - 18 活性(38)。人重组 IL - 18 在人 T 细胞上没有直接的 IFN -  $\gamma$  诱导活性, 但作用是生产 IFN -  $\gamma$  和其它 T 辅助细胞 - 1(Th1)细胞因子的共刺激物(38)。到目前为止, 认为 IL - 18 可初步作为 Th1 细胞因子产生(IFN -  $\gamma$ , IL-2 和粒细胞巨嗜细胞菌落刺激因子)的共刺激物(20), 并且也作为小鼠天然杀死细胞克隆的 FAS 配体介导的细胞毒性的共刺激物(37)。

通过克隆来自受感染组织的 IL - 18 和研究 IL - 18 基因表达, 发现了这一细胞因子与自身免疫疾病紧密相关。非肥胖性糖尿病(NOD)小鼠自发发展了自身免疫胰岛炎和糖尿病, 这两种病在单独注射了环磷酰胺时得到加速和同步。在早期胰岛炎过程中, 在 NOD 小鼠胰腺中通过逆转录酶 PCR 证明了 IL - 18 mRNA。在环磷酰胺处理后快速增加了 IL - 18 mRNA 的水平并且在此之前, IFN -  $\gamma$  mRNA 升高了, 随后发展成糖尿病。有趣的是, 这些动力学模仿了导致与单个 mRNA 水平紧密联系的 IL - 12 - p40 mRNA。在测序之后从胰腺 RNA 克隆 IL - 18 cDNA 表明从 Kupffer 细胞克隆的 IL - 18 序列和体内预活化巨嗜细胞的同一性。当没有平行处理来自 Balb/c 的巨嗜细胞, 同样 NOD 小鼠巨嗜细胞通过 IL - 18 基因表达应答环磷酰胺。所以, 在自身免疫 NOD 小鼠中 IL - 18 表达非正常地调节, 并且与糖尿病发展紧密相关(32)。

通过增大 Th1 细胞上 Fas 配体的功能活性, IL - 18 在免疫调节或炎症中起潜在作用。在肾上腺皮层中也表达了 IL - 18, 所以可以是分泌的神经免疫调节物, 在压力实验之后 orchestrating 免疫系统中起重要作用(9)。



在体内，通过裂解 pro-IL-18 形成了 IL-18，它的内源活性似乎是依赖于 P.acnes 中的 IFN- $\gamma$  的产生和由 LPS 介导的致死。因为它的活性，在人疾病中封闭 IL-18 的生物学活性是许多疾病的治疗方案。利用可溶性受体或封闭细胞结合 IL-18 受体的抗体可以达到这一目的。

细胞因子结合蛋白质(可溶性细胞因子受体)对应于它们各自的细胞表面细胞因子受体的细胞外配体结合区。与细胞表面受体相同，通过前 mRNA 的可替代拼接或通过细胞表面受体的蛋白水解的裂解可以派生它们。这样的可溶性受体在过去已经叙述过，包括其它的可溶性 IL-6 受体和 IFN- $\gamma$ (30)，TNF(11, 12)，IL-1 和 IL-4(21)，IFN- $\alpha/\beta$ (28,29)和其它。命名为骨原素(OPG, 已知是破骨细胞抑制因子-OCIF)的一个细胞因子结合蛋白质，TNFR/Fas 家族的成员似乎是只作为分泌蛋白质存在的可溶性受体的第一个例子(1,34,39)。

#### 发明概要

本发明提供了 IL-18 结合蛋白质(IL-18BP)和病毒编码的 IL-18BP 同系物(以下简称病毒 IL-18BP)，和融合蛋白质，突变蛋白，功能衍生物，活性片断和其循环的完全变化的衍生物，这些物质能够结合 IL-18。本发明也提供了从人体液分离 IL-18BP 的方法，通过重组手段获得它们的方法。本发明还提供了适于在人和其它哺乳动物中表达 IL-18BP 的 IL-18BP 的表达载体。本发明的特定的 IL-18BP，病毒编码的 IL-18BP 同系物，融合蛋白质，突变蛋白，功能衍生物，活性片断和循环变化的衍生物可用于调节和/或封闭 IL-18 的生物活性。

同时提供了含有适于在宿主细胞中表达各种 IL — 18BP 的 DNA 的可复制表达载体, 本发明转化的宿主细胞和这样的宿主表达产生的蛋白质和多肽。

本发明进一步提供了含有适当载体和 IL — 18BP 或病毒 IL — 18BP 或在人和其它哺乳动物中表达它们的载体的药物组合物, 用于治疗需要调节或封闭 IL — 18 活性的疾病或症状。

本发明进一步提供适于亲和纯化和免疫测试它们的 IL — 18BP 和病毒 IL — 18BP 的抗体。

#### 附图的说明

图 1 显示了配体亲和纯化 IL — 18 结合蛋白质的 SDS — PAGE(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)。将粗尿蛋白质(通过超滤 500 升正常人尿浓缩)加载到 IL — 18 琼脂糖柱上。洗涤, 在 pH2.2 洗脱结合的蛋白质。中和洗脱的部分, 通过非还原条件下进行 SDS — PAGE(10% 丙烯酰胺)分析, 并且银染。这些道是: 1: 粗尿蛋白质(1.5 微克, 加载到凝胶上); 2~9: 分别来自 IL — 18 琼脂糖柱的洗脱物 1~8; 10: 分子量标记, 千道尔顿, 正如右边的表明。箭头表明对应于 IL — 18BP 的带。

图 2 显示了含有  $^{125}\text{I}$  — IL — 18(表观分子量 19 千道尔顿)的复合物的 SDS — PAGE(7.5% 丙烯酰胺)的放射自显影, 这些复合物与可溶性的 IL — 18 结合蛋白质的制剂交联: 道 1: IL — 18 亲和柱的洗涤物。道 2: IL — 18 亲和柱的洗脱物 2。道 3: IL — 18 亲和柱的洗脱物 3。分子量标记表明在右边(千道尔顿)。箭头表示交联产物(58 千道尔顿)。

图 3A~图 3E 显示了 IL — 18BP 抑制 IL — 18 诱导的 IFN —  $\gamma$

的产生。

图 3A 在直接加入, 或在与尿 IL-18BP 预混合(1 小时, 37 °C)后, 利用标明的 LPS(1 微克/毫升)和人 IL-18(5 纳克/毫升)刺激(24 小时, 37 °C)小鼠脾细胞。在 24 小时后确定培养物中  $\text{muIFN-}\gamma$  的水平。

图 3B 将小鼠脾细胞与 LPS(1 微克/毫升)以及与浓度增加的人 IL-18BP 预混合(1 小时, 37 °C)的小鼠 IL-18(10 纳克/毫升)温育 24 小时。

图 3C 将小鼠脾细胞与 LPS(10 微克/毫升)以及浓度增加的人 IL-18BP 一起温育(24 小时)。

图 3D 将小鼠脾细胞与 Con A(1 微克/毫升)以及浓度增加的人 IL-18BP 一起温育(24 小时)。

图 3E 利用单独加入或在与尿 IL-18BP 预混合(1 小时, 37 °C)后的  $\text{TNF-}\alpha$ (20 纳克/毫升)和 huIL-18(25 纳克/毫升)刺激人 KG-1 细胞。

图 4 和图 4A 显示了人 IL-18BP $\alpha$  cDNA 和蛋白质的序列, 信号肽下面已划线。

图 5 和图 5A 显示了人 IL-18BP $\beta$  cDNA 和蛋白质的序列, 信号肽下面已划线。

图 6, 图 6A~图 6E 显示了人 IL-18BP $\gamma$  cDNA 和蛋白质的序列。信号肽下面已划线。

图 7 和图 7A 显示了人 IL-18BP $\delta$  cDNA 和蛋白质的序列。信号肽下面已划线。

图 8, 图 8A~图 8F 显示了人 IL-18BP 基因的序列。确定了人基因组克隆(7.1kb)的序列并且与从 3 个 cDNA 文库分离的各

种 cDNA 克隆比较。共同的翻译起始密码子是核苷酸 683~685。将 NuMA1 基因定位于负链,从核苷酸 3578 到末端。

图 9A~图 9D 显示了重组 IL-18BP 对人和小鼠 IL-18 活性的影响。

在 COS7 细胞中短暂表达了 His<sub>6</sub>-标记的 IL-18BP<sub>a</sub>,并且纯化。

图 9A 将人 IL-18(5 纳克/毫升)与 His<sub>6</sub>-标记-IL-18BP<sub>a</sub> 或 RPMI 预混合,并且与 LPS(1 微克/毫升)一起加入小鼠脾细胞。在 24 小时后测量 IFN- $\gamma$  产生。

图 9B 将小鼠 IL-18(10 纳克/毫升)与 His<sub>6</sub>-标记-IL-18BP<sub>a</sub> 或 RPMI 预混合,并且与 LPS(1 微克/毫升)一起加入小鼠脾细胞。在 24 小时后测量 IFN- $\gamma$  产生。

图 9C 将人 IL-18(25 纳克/毫升)与 COS7-IL-18BP<sub>a</sub> 或 RPMI 一起预混合,并且加入存在 IL-12(10 纳克/毫升)的人 PBMC。

图 9D 将人 IL-18(25 纳克/毫升)与 COS7-IL-18BP<sub>a</sub> 或 RPMI 预混合,并且在存在 TNF- $\alpha$ (20 纳克/毫升)时加入人 KG-1 细胞。

#### 本发明的详细说明

本发明涉及结合 IL-18 的各种 IL-18BP 和病毒 IL-18BP。这样的 IL-18BP 能够调节和/或封闭 IL-18 的生物活性。术语“IL-18BP 和病毒 IL-18BP”包括成熟蛋白质(没有信号序列),含有信号序列的蛋白质,IL-18BP 的突变蛋白和病毒 IL-18BP,IL-18BP 的衍生物和病毒 IL-18BP 和



于特别宿主利用的可操作连接的启动子，表达增强子，调节序列等的 IL-18BP 表达可以制备各种 IL-18BP 和病毒 IL-18BP。

在治疗和减轻 IL-18 参与或过量外源给药或外源产生的 IL-18 引起的疾病中可以利用在人和其它哺乳动物中表达 IL-18BP 的各种 IL-18BP 和病毒 IL-18BP 和载体。这样的病症可以是自身免疫疾病，I 型糖尿病，类风湿关节炎，移植排斥，肠炎疾病，脓毒，多发性硬化，局部缺血性心脏病(包括心脏病发作)，局部缺血性脑损伤，慢性肝炎，牛皮癣，慢性胰腺炎，急性胰腺炎等。

根据本发明，通过一个层析步骤从正常人尿分离 IL-18BP。将从 500 升正常人尿浓缩的粗人尿蛋白质制剂加载到含有结合琼脂糖的人 IL-18 的柱。洗涤，在低 pH 洗脱结合的蛋白质。中和洗脱的部分，在非还原条件下通过 SDS-PAGE(10%丙烯酰胺)分析等分试样和银染。在洗脱部分特异地获得了约 40 千道尔顿的蛋白质带(图 1)。

如 IL-18 结合蛋白质，通过它与  $^{125}\text{I}$ -IL-18 特异地交联的能力鉴定在第一步中获得的约 40 千道尔顿蛋白质(图 2)。通过 N 末端蛋白质序列分析进一步鉴定了约 40 千道尔顿蛋白质。将来自洗脱蛋白质的等分试样进行 SDS-PAGE，电印到 PVDF 膜上，进行蛋白质微序列分析。同样，将来自洗脱蛋白质的等分试样进行直接的蛋白质微序列分析。在两种情况中，获得了两个多肽序列。大序列和小序列，后者对应于人防卫素(登记号 p11398)的片断，在氨基酸 65 开始。减去已知的防卫素序列提供了下面的序列：

T - P - V - S - Q - Q - x - x - x - A - A - A

1 : : : 5 : : : 10 : : :

其中 x 代表仍未确定的氨基酸。

为了获得更长或更准确的序列，和为了鉴定潜在的半胱氨酸残基，在变性条件下利用 DTT 还原洗脱部分的等分试样，与 4-乙烯吡啶反应，通过微超滤装置脱盐(Ultrafree, 截止分子量 10,000 Da, Millipore)并且进行蛋白质微序列分析。在序列循环 1 号后，将残留的蛋白质与邻苯二醛反应以便封闭所有 N 末端多肽而不是 Pro 并且然后恢复测序。在这一方法中，获得了下面的单个蛋白质序列：

TPVSQXXXAA XASVRSTKDP CPSQPPVFPA AKQCPALEVT

1 10 20 30 40

(T=Thr;P=Pro;V=Val;S=Ser;Q=Gln;X=未知;A=Ala;R=Arg;K=Lys;D=Asp;C=Cys;F=Phe;L=Leu;E=Glu)

正如研究蛋白质数据库确定的，得到的序列明显不同于任何其它已知蛋白质。但是，通过 tblastn 研究程序基因组研究所 (TIGR)([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 的数据库研究提供了指示为 THC123801 的 cDNA 文档，当翻译时，它的开放读码框架 (218 个密码子) 含有与 IL-18BP 的 N 末端序列高度同源的序列。下面显示了同源性：

```
1 .....TPVSQXXXAAXASVRSTKDPCPSQPPVFPAAKQCPALEVT... 40
51 VTLLVRATXVXQTTTAATASVRSTKDPCPSQPPVFPAAKQCPALEVTWPE 100
```

[上面的序列 (1~40) 是本发明分离的 IL-18BP；下面的序列 (51~100) 是 TIGR 文档 THC123801 的 cDNA 翻译推断的]。

但是，鉴定为 THC123801 的 cDNA 序列仅仅是 EST (表达序列标记)，即随机选择的 cDNA 克隆。还从来没有分析这一 EST 是否含有开放读码框架，蛋白质是否从对应于 EST 的基因表达

或从 EST 本身表达,甚至也没有鉴定的 THC123801 编码的蛋白质的任何功能。完全没有得到 THC123801 含有编码 IL-18BP 的开放读码框架的信息。

形成了保留结合它的标记配体( $^{125}$ I-IL-18),接着共价交联分子量为 58 千道尔顿的复合物的能力的亲和纯化 IL-18BP。这一复合物的分子量对应于 1:1 的约 40 千道尔顿 IL-18BP 和 19 千道尔顿的 IL-18(图 2)。

亲和纯化的尿 IL-18BP 封闭了人以及小鼠 IL-18 的生物活性。所以,当在人或小鼠 IL-18 中加入 IL-18BP 时,它封闭了 IL-18 当与脂多糖(LPS)一起加入培养小鼠脾细胞时诱导干扰素 $\gamma$ 的生产的能力(图 3)。

为了本发明叙述的目的,表达“IL-18 的生物活性”特别指至少下面的生物特性的一个:

(i) 在各种细胞类型如单核细胞,小鼠脾细胞,人周边血液单核细胞,人 KG-1 细胞系和 T 细胞中诱导初步作为与促分裂原,IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$ , LPS 的共刺激物的 IFN- $\gamma$ ,

(ii) 增强 T 细胞的增殖,

(iii) 增强初步作为共刺激物体外 Th-1 细胞因子的产生,

(iv) IL-12 与增强 IFN- $\gamma$  产生的协同作用, IFN- $\gamma$  和其它 T 辅助细胞-1 细胞因子的产生的共刺激作用,

(v) 小鼠天然杀死细胞系的 FAS 配体介导的细胞毒性的共刺激作用,

(vi) 在人 KG-1 细胞中,可能通过诱导 50NF- $\kappa$ B 同型二聚体和 p65/p50NF- $\kappa$ B 异型二聚体的形成,诱导 NF- $\kappa$ B 的活化,



(vii) 诱导 IL-8。

正如本发明所用，“结合 IL-18”的表达指当如本发明实施例 2 亲和纯化时，正如它结合标记的 IL-18 表明的，IL-18BP 结合 IL-18 的能力。

正如本发明所用，“调节 IL-18 的活性”的表达指 IL-18BP 调节任何 IL-18 活性而不是封闭的能力，如部分抑制，增强或诸如此类。

正如本发明所用，“封闭 IL-18 的活性”的表达指 IL-18BP 封闭至少上面举出的 IL-18 的生物活性的至少一个的活性。IL-18BP 封闭小鼠脾细胞中与 IFN- $\gamma$  的表达相关的 IL-18 的能力是 IL-18 封闭 IL-18BP 的活性的例子。正如下面将详细显示的，调节或封闭 IL-18BP 的活性部分是由于 IL-18BP 通过 IL-18 抑制 NF- $\kappa$ B 的活性的事实。另外，IL-18BP 至少封闭一个下面的 IL-18 的活性，即在人和小鼠细胞中 IFN- $\gamma$  的诱导，IL-8 的诱导和 NF- $\kappa$ B 的活化。

通过利用特定的有意义和反义引物，和来自人 Jurkat T 细胞的 RNA 以及来自 TIGR 序列的引物的逆转录 PCR 制备筛选 cDNA 文库的 DNA 探针。通过 DNA 序列分析证实了得到的 PCR 产物。利用  $^{32}$ [P] 标记 PCR 产物，并且用作筛选起源于周边血液单核细胞，Jurkat T 细胞系，PBMC 和人脾脏的四个人 cDNA 文库的探针。各种独立的 cDNA 克隆对应于四个 IL-18BP 拼接突变体 (SEQ ID NO: 1, 3, 5 和 7)。所有拼接突变体编码推定的可溶性分泌蛋白质。大多数富余的一个 (IL-18BP $\alpha$ ) 具有编码信号肽的 192 个密码子的开放读码框架，本发明有时称为 28 个氨基酸残基的“引导序列”，接着成熟的推断的 IL-18BP $\alpha$ ，该结合蛋白质的开始 40 个残基完美地匹配了鼠 IL-18BP 的 N 末端蛋白质序

列(SEQ ID NO:2)。半胱氨酸残基的位置表明了这一多肽属于免疫球蛋白(Ig)超家族。有趣的是,在成熟 IL-18BP<sub>a</sub> 内的四个 Gln 残基的每个都是一个潜在的 N 糖基化位点。三个其它的 IL-18BP 突变体没有 IL-18BP<sub>a</sub> 丰富。它们包括编码接着 85 个氨基酸残基的成熟蛋白质的 28 个氨基酸残基的信号肽的更短的 1kb IL-18BP<sub>b</sub> cDNA(SEQ ID NO:4)。编码接着 169 个氨基酸残基的成熟 IL-18BP 的 28 个氨基酸残基的信号肽的 2.3kb cDNA 表示的是第三个突变体, IL-18BP<sub>c</sub>(SEQ ID NO:6)。第四个 IL-18BP<sub>d</sub>, 是编码接着 133 个氨基酸残基的成熟 IL-18BP 的 28 个氨基酸残基的信号肽(SEQ ID NO:8)。

为了进一步研究可能存在另外的 IL-18BP 拼接突变体,利用对应于全长 IL-18BP cDNA 的探针筛选人基因组文库。在这一文库中鉴定了在长度上有区别的 5 个基因组克隆。就这些克隆利用外部和内部引物进行 DNA 序列分析。同时,从这些克隆组装了 7.8kb 序列(SEQ ID NO:9)。在 7.8kb 序列内没有鉴定跨膜(TM)受体的外显子编码。所有突变体共享共同的翻译起始位点,编码相同的 28 个氨基酸残基的信号肽和大小变化的可溶性成熟蛋白质和 C 末端序列。IL-18BP 基因座含有编码定位于负链的核有丝分裂器蛋白质-1(NUMA1)的其它基因。这一发现将 IL-18BP 基因定位于人染色体 11q13(36)。

利用 IL-18BP<sub>a</sub> 的完整蛋白质序列和 GenPept 数据库([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))进行同源性研究,其中利用了 Smith Watermann 算法。发现在几个痘病毒中作为前面未知功能的分泌蛋白质表达的 IL-18BP 同系物。前面已经报道这些病毒编码各种细胞因子受体,并且这样的病毒编码的分子的作用是通过中和其相应的细胞因子抑制免疫应答的引诱受体

(Spriggs,MK,1994,当前免疫学评论, 6: 526~529)。所以, 本发明另外涉及了可以作为 IL-18 的生物活性封闭物或调节物的病毒编码的 IL-18BP 的同系物。表 1 提供了病毒编码的 IL-18BP 的同系物的实施例。

根据本发明, 在原核生物或真核生物宿主中可以表达病毒编码的 IL-18BP 的同系物。正如本发明所用, “病毒编码的 IL-18BP 同系物”的表达指至少 70% 的氨基酸残基的序列中至少有 50% 的相似性。更优选地, 在 100 个氨基酸残基的序列中它具有至少 50%, 至少 60%, 至少 70%, 至少 80% 或最优选地至少 90% 的相似性。

表 1 病毒编码的蛋白质显示了与人 IL-18BP 高度同源

GenPept 序列	病毒类型
MCU60315_54	U60315 感染性软疣病毒亚型 1
MCU60315_53	U60315 感染性软疣病毒亚型 1
SWPHLSB_12	L22013 天鹅痘病毒
CV41KBPL_14	母牛痘病毒
VVCGAA_5	天花病毒
U01161_3 174	缺肢病毒(小鼠痘病毒)
VVU18340_6	天花病毒
VVU18338_7	天花病毒
VVU18337_7	天花病毒
VARCG_7 173	天花主要病毒
MCU60315_51	感染性软疣病毒
HNABV_1	新型肝炎非 A, 非 B 相关病毒

在猴 COS7 细胞中表达了 IL-18BP<sub>a</sub>。为了这一目的，在哺乳动物表达载体 pEF-BOS 中插入了 IL-18BP<sub>a</sub> 的 cDNA。为了简化重组蛋白质的纯化，在框架内的 IL-18BP ORF 的 3' 末端加入编码 (His)<sub>6</sub> 序列的盒子。利用表达载体短暂转染 COS7 细胞，并且通过金属整合层析浓缩和纯化这些细胞的无血清培养基 (150 毫升)。在还原和非还原条件下在银染的 SDS-PAGE 上 IL-18BP<sub>a</sub> 作为单一的带，并且具有与尿 IL-18BP 相同的表观分子量。这一制剂的蛋白质序列分析表明与尿 IL-18BP 相同的 N 末端序列。利用抗尿 IL-18BP 的抗体免疫影印分析 IL-18BP<sub>a</sub> 表明与尿蛋白质相同的分子量带。另外，利用免疫沉淀接着利用 SDS-PAGE 和放射自显影，IL-18BP<sub>a</sub> 能够取代 <sup>125</sup>I-IL-18BP，与抗体结合。所以，IL-18BP<sub>a</sub> 结构上对应于从尿中分离的 IL-18BP。

测试粗和纯化的 IL-18BP<sub>a</sub> 的抑制 IL-18 的生物活性的能力。在小鼠脾细胞，PBMC 和人 KG-1 细胞系中 IL-18BP<sub>a</sub> 抑制人和小鼠 IL-18 的活性 (图 9)。这些结果证实了作为编码生物活性 IL-18BP 的 IL-18BP<sub>a</sub> cDNA 的特征。

本发明还涉及突变蛋白质和 IL-18BP 的片断，和病毒 IL-18BP，涉及含有与其它多肽或蛋白质融合的野生型 IL-18BP 的融合蛋白质和病毒 IL-18BP 或它们的突变蛋白或它们的片断并且能够结合 IL-18 或它的同系物的融合蛋白质。

正如本发明所用，术语“突变蛋白”指其中不同的氨基酸残基替代了天然 IL-18BP 或病毒 IL-18BP 的一个或多个氨基酸

残基，或缺失一个或多个氨基酸残基，或在 IL-18BP，或病毒 IL-18BP 的天然序列中加入一个或多个氨基酸残基，而与野生型 IL-18BP 或病毒 IL-18BP 相比，在得到的产物结合 IL-18 的能力的 IL-18BP 的类似物或病毒 IL-18BP 的类似物上没有相当大地改变。通过已知的合成和/或定位诱变技术，或任何适当的已知技术可以制备这些突变蛋白。

任何这样的突变蛋白质优选地具有足够复制 IL-18BP 或足够复制病毒 IL-18BP 的氨基酸序列，以致具有与 IL-18BP 基本相似的活性。IL-18BP 的一个活性是它结合 IL-18 的能力。只要突变蛋白具有 IL-18 的基本结合活性，它就可以用于例如通过亲和层析对 IL-18 进行纯化，所以可以认为基本具有 IL-18BP 的相似的活性。所以，通过常规实验手段包括将这样的突变蛋白例如进行简单的三明治竞争测试确定是否任何给定的突变蛋白基本具有与 IL-18BP 相同的活性，以便如放射性免疫测试或 ELISA 测试确定它是否结合适当标记的 IL-18。

在优选的实施例中，任何这样的突变蛋白与 IL-18BP 或病毒编码的 IL-18BP 同系物的序列至少具有 40% 的同一性或同源性。更优选地，它具有至少 50%，至少 60%，至少 70%，至少 80% 或最优选地至少 90% 的同一性或同源性。

根据本发明可以利用的 IL-18BP 多肽的突变蛋白或病毒 IL-18BP 的突变蛋白，或编码它们的核酸包括没有根据本发明表示的指导和说明进行实验，通过本领域的普通技术人员常规获得的基本对应于替代肽或多肽的有限套序列。对于蛋白质化学和结

构的详细说明，参见 Schulz, G.E. 等人，蛋白质结构的原理，Springer-Verlag, 纽约，1978；Creighton, T.E., 蛋白质：结构和分子特性，W.H. Freeman 和 Co, 旧金山，1983，将它引入本发明作为参考。对于核苷酸序列替代的表示如密码子优先，参见 Ausubel 等人，出处同上，在 A.1.1~A.1.24, 和 Sambrook 等人，出处同上，在附录 C 和 D 中。

本发明的优选的突变蛋白的变化是已知为“保守”的替代。保守的 IL-18BP 多肽或蛋白质或病毒 IL-18BP 的氨基酸替代可以在具有足够相似的物理化学特性的基团内包括同义氨基酸，以致基团的成员之间的替代将保留分子的生物学功能，Grantham, 科学，185 卷，862~864(1974)。清楚的是在上面确定的序列中没有改变它们的功能，特别是如果插入或缺失仅仅包括几个氨基酸，例如 30 个以下，和优选地 10 个以下，并且没有除去或替代功能构型的关键氨基酸，例如，半胱氨酸残基，可以进行氨基酸的插入和缺失，Anfinsen, “控制蛋白质链的折叠的原理”，科学，181 卷，223~230(1973)。在本发明的范围内出现了这样的缺失和/或插入产生的蛋白质和突变蛋白。

但是，如果为了避免形成可以引起 IL-18BP 的活性的减弱的不必要的分子内或分子间的二硫键，利用其它残基可以替代生物活性不需要的半胱氨酸。

优选地，同义氨基酸基团已在表 I 中确定。优选地，同义氨基酸基团已在表 II 中确定；最优选地同义氨基酸基团已在表 III 中确定。

表 I 同义氨基酸的优选基团

氨基酸	同义基团
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

表 II 同义氨基酸的更优选的基团

氨基酸	同义基团
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp



表 III 同义氨基酸的最优选的基团

氨基酸	同义基团
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

可以用于获得用于本发明的 IL-18BP 多肽或蛋白质的突变蛋白或病毒 IL-18BP 的产生突变蛋白的蛋白质氨基酸取代的实施例包括任何已知的方法步骤，如授予 Mark 等人的美国专利 RE33,653，4,959,314，4,588,585 和 4,737,462；授予 Koths 等人的 5,116,943；授予 Namen 等人的 4,965,195；授予 Chong 等人的 4,879,111；和授予 Lee 等人的 5,017,691；和美国专利第 4,904,584 号中表示的赖氨酸取代蛋白质 (Shaw 等人)。

在本发明的另一个优选地实施例中，IL-18BP 或病毒 IL-18BP 的突变蛋白具有基本对应于 IL-18BP 或病毒 IL-18BP 的氨基酸序列。术语“基本对应于”可理解为具有与天然蛋白质的序列变化最小的蛋白质，最小变化不影响特别是它们结合 IL-18 的能力范围内的天然蛋白质的基本特征。通常认为在“基本对应于”范围内的该类型的变化是来自编码这些蛋白质的 DNA 的常规诱变技术，导致几个小的修饰，并且以上面讨论的方式筛选需要的活性。除了结合 IL-18，突变蛋白也可以调节和/或封闭 IL-18 活性。

本发明的突变蛋白包括在严格条件下根据本发明与编码 IL-18BP 或编码病毒 IL-18BP 的 DNA 或 RNA 杂交的核酸如 DNA 或 RNA 编码的蛋白质。本发明也包括这样的核酸，它可以在需要的核酸的鉴定和纯化中用作探针。另外，这样的核酸将是确定是否它编码保留本发明的 IL-18BP 的功能活性的多肽的引物候选物。术语“严格条件”指本领域普通技术人员称为“严格”的杂交和随后的洗涤条件。参见 Ausubel 等人，分子生物学中的当前方案，出处同上，Interscience，纽约，6.3 和 6.4 章 (1987,1992)，和 Sambrook 等人，出处同上。没有限制地，严

格条件的例子包括低于研究的杂交的计算  $T_m$  12~20 °C, 例如, 2 x SSC 和 0.5% SDS 5 分钟, 2 x SSC 和 0.1% SDS 15 分钟; 0.1 x SSC 和 0.5% SDS, 在 37 °C 30~60 分钟, 然后, 0.1 x SSC 和 0.5% SDS 在 68 °C 30~60 分钟的洗涤条件。本领域技术人员理解的那些严格条件也取决于 DNA 序列, 寡核苷酸探针(如 10~40 碱基)或混合的寡核苷酸探针的长度。如果使用的是混合探针, 优选地利用四甲基氯化胺(TMAC)而不是 SSC。参见 Ausubel, 出处同上。

本发明进一步包括编码本发明的 IL-18BP, 但由于遗传密码的简并性而在密码子序列中有区别的核酸。在严格条件下与图 4 到图 7 显示的 DNA 序列可能不杂交, 但能够编码本发明的 IL-18BP 的 DNA 也包括在本发明中。

术语“融合蛋白质”指含有与在体液中具有延长的残留时间的另一个蛋白质融合的 IL-18BP 或病毒 IL-18BP 或其突变蛋白的多肽。所以, IL-18BP 或病毒 IL-18BP 可以与另一个蛋白质, 多肽或诸如此类, 例如免疫球蛋白或其片断融合。它也可以与聚乙二醇(PEG)融合以便延长残留时间。

本发明的术语“盐”指 IL-18BP, 病毒 IL-18BP, 突变蛋白或其融合蛋白质的羧基基团的盐和氨基基团的酸加入盐。羧基基团的盐可以通过本领域已知的手段形成, 并且包括无机盐例如, 钠, 钙, 铵, 铁或锌盐等, 和正如与胺如三乙醇胺, 精氨酸, 或赖氨酸, 吡啶, 普鲁卡因和诸如此类形成的那些有机碱的盐。酸加入盐包括例如与例如盐酸, 或硫酸的矿物质酸形成的盐, 和含有例如乙酸或草酸有机酸的盐。当然, 任何这样的盐必须基本具有与 IL-18BP 相似的活性。

如本发明所用的“功能衍生物”覆盖了可以通过本领域的已知手段从作为残基或 N 或 C 末端基团上的侧链存在的功能基团制备,和只要它们保留药物可接受即它们不破坏与 IL-18BP 或病毒 IL-18BP 的活性基本相似的蛋白质的活性,并且不给予含有它的组合物毒性的特点就包括在本发明的 IL-18BP,或病毒 IL-18BP 或它们的突变蛋白质和融合蛋白的衍生物。这些衍生物可以例如包括聚乙二醇侧链,该侧链可以模拟抗原位点和在体液中延长 IL-18BP 或病毒 IL-18BP 的残留。其它衍生物包括羧基的脂肪族酯,通过与胺或与初级或次级胺反应形成羧基的酰胺,与酰基成份(例如,阿尔卡诺或碳环芳香基团)形成的氨基酸残基的无氨基基团的 N 酰基衍生物或与酰基成份形成的游离羧基(例如,丝氨酰或苏氨酰残基)的 O-酰基衍生物。

关于 IL-18BP,突变蛋白和融合蛋白质的“活性部分”,假如所述部分基本保留了结合 IL-18 的能力,本发明覆盖了蛋白质分子单独或与相关分子或其连接的残基,例如,糖或磷酸残基,或蛋白质分子或糖残基本身的聚集体的多肽链的融合片断或前体。

本发明所用的术语“环变化的衍生物”指其中末端已经直接或通过接头连接在一起以便产生环状分子的线性分子,然后环状分子在另一个位置打开以便产生新的线性分子,其末端不同于原始分子的末端。环状变化包括那些结构等同于已经环化和然后打开的分子的分子。所以,可以重新作为线性分子合成环状变化分子,并且从不进行环化和打开步骤。WO95/27732 中公开了环状变化衍生物的制备。

各种重组细胞如原核细胞例如大肠杆菌,或其它真核细胞如

酵母或昆虫细胞可以产生 IL — 18BP 或病毒 IL — 18BP。为了产生重组 IL — 18BP 或病毒 IL — 18BP，构建携带编码 IL — 18BP 并且适于转染(例如，大肠杆菌，哺乳动物细胞和酵母细胞)或感染昆虫细胞的 DNA 的适当载体的方法是本领域已知的。参见例如，Ausubel 等人，“分子生物学中的当前方案”当前方案，1993，和 Sambrook 等人，“分子克隆，实验室手册”第二版，科尔德斯普林港出版社，1989。

为了表达 IL — 18BP 蛋白质或病毒 IL — 18BP，将编码 IL — 18BP 或病毒 IL — 18BP，它们的片断，突变蛋白或融合蛋白质和可操作地连接的转录和翻译调节信号的 DNA 插入能够在宿主细胞染色体中整合需要的基因序列的载体中。为了能够选择已经在它们的染色体中稳定整合导入的 DNA 的细胞，利用了允许选择含有表达载体的宿主细胞的一个或多个标记。该标记可以提供营养缺陷型宿主原养型杀生物抗性，例如抗生素，或重金属抗性例如铜或诸如此类。可选择标记基因可以直接与表达的 DNA 基因序列连接或通过转染导入同样的细胞。其它元素也是单链结合蛋白质 mRNA 的最佳合成所需要的。这些元素可以包括拼接信号，以及转录启动子，增强子和终止信号。

优选地将导入选择的细胞的所述的 DNA 分子掺入能够在受体宿主中自我复制的质粒或病毒载体中。优选的原核质粒是 pBr322 的衍生物。优选的真核载体包括 BPV，疫苗，SV40，2 — 微米环等，或它们的衍生物。这样的质粒和载体是本领域已知的(2~5,22)。一旦已经制备了用于表达的含有构建体的载体或 DNA 序列，可以将表达载体通过任何种类的适当手段，如转化，转染，脂转染，共轭，原生质体融合，电穿孔，磷酸钙沉淀，直

接微注射等导入适当的宿主细胞。

在本发明中所利用的宿主细胞可以是原核或真核的。优选的原核宿主包括细菌如大肠杆菌，芽胞杆菌，链霉菌，假单胞菌，沙门氏菌，沙雷氏菌等。最优选地宿主是大肠杆菌。特别有利的细菌宿主包括大肠杆菌 K12 菌株 294(ATCC 31446)，大肠杆菌 X1776(ATCC 31537)，大肠杆菌 W3110(F<sup>-</sup>, λ<sup>-</sup>, 向光性(ATCC 27325)。在这样的条件下，蛋白质将不糖基化。原核宿主必须与复制子和表达质粒中的控制序列相容。

但是，因为天然 IL-18BP 是糖基化蛋白质，真核宿主比原核宿主优选。优选的真核宿主是哺乳动物细胞，例如，人，猴，小鼠，和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞，因为它们提供蛋白质分子翻译后修饰，包括正确的折叠，正确的二硫键形成，以及在正确的位点糖基化。同样酵母细胞和昆虫细胞可以进行翻译后肽修饰包括高甘露糖糖基化。

存在许多重组 DNA 方案，它们利用了强启动子序列和高拷贝数的质粒，它们可以用于在酵母和昆虫细胞中产生需要的蛋白质。酵母和昆虫细胞识别了克隆的哺乳动物基因产物上的引导序列和分泌成熟的 IL-18BP。在导入载体后，在选择含有载体的细胞的生长的选择性培养基中可以生长宿主细胞。克隆的基因序列的表达导致产生了 IL-18BP，病毒 IL-18BP，融合蛋白质，或其突变蛋白或片断。在下面的实施例中详细叙述了上面提到的克隆，克隆分离，鉴定，定性和测序方法。

然后通过任何常规方法包括提取，沉淀，亲和层析，电泳或诸如此类或通过利用例如固定在柱内包含的凝胶基质上的抗 IL-18BP 单克隆抗体的亲和层析分离和纯化表达的蛋白质。含有

所述的重组 IL-18BP 的粗制剂通过柱, 因此 IL-18BP 将通过特异的抗体结合柱, 而不纯物质通过柱。在洗涤后, 在通常用于该目的的条件下, 即在高或低 pH, 例如 pH11 或 pH2 从凝胶洗脱蛋白质。

本发明进一步涉及用于在哺乳动物, 和更具体地说在人中, 表达 IL-18BP 或病毒 IL-18 或它们的衍生物的载体。在哺乳动物中短期和长期表达基因的载体在文献中已有记载。研究已经表明将基因释放到例如, 骨骼肌肉, 血管平滑肌和肝导致的治疗的蛋白质在系统水平。骨骼肌肉是有用的靶, 因为它的大质量, 血管供应和易接近性。但是, 已经成功地利用了其它靶和特定地免疫细胞的骨髓前体。例如在肌肉中表达蛋白质的目前可得载体包括质粒 DNA, 脂质体, 蛋白质-DNA 共轭物和基于腺病毒, 腺相关病毒和肝炎病毒的载体。在这些之间, 关于基因表达的时间和水平和出于安全性考虑, 基于腺相关的病毒(AAV)的载体已经是最成功的(Kessler, P. D. 1996, 美国科学院院刊, 93, 14082~4087)。

在 Snyder 等人, 1996, 人遗传学中的当前方案, 12.1.1~12.1.17 章, John Wiley 和 Sons 中详细叙述了 AAV 基础的载体的构建方法, 并且引入本发明中。简要地说, 利用限制酶 Xba I 裂解含有野生型 AAV 基因组的质粒 psub201, 并且与含有有效的真核生物启动子, 例如, 巨细胞病毒启动子, Kozak 同感序列, 编码 IL-18BP 或病毒 IL-18BP 的 DNA 序列, 或它们的突变蛋白或融合蛋白质或其片断, 适当的 3' 未翻译区和多聚腺苷酸化信号, 例如, 猴病毒 40 的多聚腺苷酸化信号的构建体连接。利用辅助 AAV 质粒, 例如 pAAV/Ad 将得到的重组质粒

共转染进入哺乳动物细胞，例如人 T293 细胞。然后，利用腺病毒作为辅助病毒感染培养物，并且在 48~60 小时后收集培养上清液。通过硫酸铵沉淀分级分离上清液，在 CsCl 密度梯度上纯化，透析，然后在 56 °C 加热以便破坏任何腺病毒，而得到能够表达 IL-18BP 或病毒 IL-18BP 或它们的突变蛋白或融合蛋白质的重组 AAV 在这一步骤保持稳定。

迄今为止，还没有确立可溶性细胞因子的受体的生理作用。可溶性受体结合它们的特异的配体，并且在大多数情况中抑制它们的生物活性，正如 TNF 系统中显示的(11,12)。在很少的情况中，例如 IL-6，可溶性受体增强生物活性。在动物模型中发现重组可溶性 TNF 受体也已知为 TBP(TNF 结合蛋白质)能够预防败血性休克，同时发现 IL-1 受体的可溶性形式对小鼠异接受体中体内同种异体反应性的发展具有深远的抑制效果。

同样，可以发现本发明的 IL-18BP 和病毒 IL-18BP 在 I 型糖尿病中，在脓毒血症，在自身免疫疾病，在移植排斥，类风湿关节炎，肠炎疾病，脓毒血症，多发性硬化，局部缺血性心脏病，包括急性心脏病发作，局部缺血性脑损伤，慢性肝炎，牛皮癣，慢性肝炎和急性肝炎中用作调节 IL-18 活性的调节物。所以，它们可以用于任何疾病，其中内源产生或外源给药 IL-18 诱导疾病或恶化病人的情况。

本发明进一步涉及含有药物可接受载体和本发明的 IL-18BP 或病毒 IL-18BP 或它们的活性突变蛋白，融合蛋白质及其盐，功能衍生物或其活性部分的药物组合物。

本发明进一步涉及含有药物可接受载体和例如，病毒载体如任何一个所述的基于 AAV 的病毒载体或表达 IL-18BP 或病毒



IL — 18BP 或它们的突变蛋白，其片断或融合蛋白质和适于为了表达体内本发明的 IL — 18BP 和病毒 IL — 18BP 或它们的突变蛋白片断或融合蛋白质，对人和其它哺乳动物给药，用于基因治疗的另一个载体的药物组合物。

通过将 IL — 18BP，或病毒 IL — 18BP 或它们的衍生物，或表达它们的载体与生理可接受载体，和/或稳定剂和/或赋形剂混合，并且通过在剂量小瓶中冻干制备成剂量形式制备用于给药的本发明的药物组合物。给药的方法可以通过相似试剂的给药的任何可接受方式，并且将取决于待治疗的病症，例如，静脉内，肌肉内，皮下，通过局部注射或局部应用，或连续输入等。给药的活性化合物的量将取决于给药的途径，待治疗的疾病和病人的症状。例如局部注射将在体重基础上比静脉内输入需要的蛋白质的量更低。

因此，表明 IL — 18BP，或病毒 IL — 18BP 或体内表达它们的载体用于治疗自身免疫疾病，I型糖尿病，类风湿关节炎，移植排斥，肠炎疾病，脓毒血症，多发性硬化，局部缺血性心脏病包括急性心脏病发作，局部缺血性脑损伤，慢性肝炎，牛皮癣，慢性胰腺炎，急性胰腺炎，和相似的疾病，其中存在 IL — 18 的异常表达，导致过量的 IL — 18 或由于外源给药 IL — 18 引起的并发症的情况。

本发明也包括抗 IL — 18BP 或病毒 IL — 18BP，以及抗它们的突变蛋白，融合蛋白质，盐，功能衍生物和活性部分的抗体。术语“抗体”指包括在可溶或结合形式中可以标记的多克隆抗体，单克隆抗体 (MAbs)，嵌合抗体，抗独特型 (抗 Id) 抗体的抗体，以及任何现有技术如并不限于酶裂解，肽合成或重组技术提供的人

化抗体及其片断。

多克隆抗体是起源于利用抗原免疫的动物的血清的抗体分子的异源群体。单克隆抗体基本含有特异于抗原的抗体的同源群体，该群体基本含有相似的表位结合位点。通过本领域普通技术人员已知的方法可以获得 MAb。参见例如，Kohler 和 Milstein, 自然, 256: 495~497(1975); 美国专利第 4,376,110 号; Ausubel 等人, 出处同上, 编辑, Harlow 和 Lane, 抗体, 实验室手册, 科尔德斯普林港实验室, (1988); 和 Colligan 等人编辑, 在免疫学中的当前方案, Greene 出版协会, 和 Wiley Interscience 纽约(1992,1993), 将这些参考文献的内容全部引入本发明作为参考。这样的抗体可以是任何免疫球蛋白的类别包括 IgG, IgM, IgE, IgA, GILD 和其任何亚类。产生本发明的 MAb 的杂交瘤可以在体外, 原位或体内培养。体内或与原位产生高效价的 Mab 使这成为目前优选的生产方法。

嵌合抗体是不同部分起源于不同动物种类, 如具有起源于小鼠 MAb 的可变区和人免疫球蛋白恒定区的分子。将嵌合抗体初步用于减弱应用中的免疫原性, 和增强生产的产量, 例如小鼠 Mab 在杂交瘤中有较高的产量, 但在人中具有更高的免疫原性, 以致利用了人/小鼠嵌合 MAb。嵌合抗体和它们生产的方法是本领域公知的 (Cabilly 等人, 美国科学院院刊, 81: 3273~3277(1984); Morrison 等人, 美国科学院院刊, 81: 6851~6855(1984); Boulianne 等人, 自然, 312: 643~646(1984); Cabilly 等人, 欧洲专利申请 125023(1984 年 11 月 14 日公开); Neuberger 等人, 自然, 314: 268~270(1985); Taniguchi 等人, 欧洲专利申请 171496(1985

年2月19日公开); Morrison等人, 欧洲专利申请 173494(1986年3月5日公开); Neuberger等人, PCT 申请 WO8601533(1986年3月13日公开); Kudo等人, 欧洲专利申请 184187(1986年6月11日公开); Morrison等人, 欧洲专利申请 173494(1986年3月5日公开); Sahagan等人, 免疫学杂志, 137: 1066~1074(1986); Robinson等人, 国际专利申请 WO9702671(1987年5月7日公开); Liu等人, 美国科学院院刊, 84: 3439~3443(1987); Sun等人, 美国科学院院刊 84: 214~218(1987); Better等人, 科学, 240: 1041~1043(1988); 和 Harlow 和 Lane, 抗体, 实验室手册, 出处同上。这些参考完全引入本发明。

抗独特型(抗 Id)抗体是识别通常与抗体的抗原结合位点相关的独特的决定簇的抗体。通过利用抗 Id 正在制备的 MAb 免疫作为 MAb 来源的相同种类的动物和基因型(例如, 小鼠菌株)可以制备 Id 抗体。免疫的动物通过产生抗这些独特型决定簇的抗体(抗 Id 抗体)识别和应答免疫抗体的独特型决定簇。参见例如, 美国专利第 4,699,880 号, 将它全部引入本发明。

抗 Id 抗体也可以用作“免疫原”以便在产生所谓抗-抗 Id 抗体的另一个动物中诱导免疫应答。抗-抗 Id 的表位相同于诱导抗-Id 的原始 MAb。所以, 通过来源于 MAb 的独特型决定簇的抗体, 有可能鉴定表达相同特异性的抗体的其它克隆。

因此, 可以利用抗 IL-18BP 产生的 MAb 和本发明的相关蛋白质在适当的动物中, 例如 BALB/c 小鼠中诱导抗-Id 抗体。将来自这样的免疫小鼠的脾细胞用于产生分泌抗-Id MAb 的抗-Id 杂交瘤。另外, 抗 Id Mab 可以与载体如匙孔血蓝蛋白(KLH)

偶联，并且用于免疫其它 BALB/c 小鼠。来自这些小鼠的血清将含有具有特异于 IL-18BP 表位或病毒 IL-18BP 的表位的原始 MAb 的结合特性的抗-抗 Id 抗体。

所以，抗-Id MAb 具有它们自己的独特型表位，或结构相似于评估的表位如 IL-18BP 或病毒 IL-18BP 的“独特性”。

术语“人化抗体”指包括例如，通过基因工程方法操作小鼠抗体获得的抗体，以便与人体更相容。这样的人化抗体在人中具有减弱的免疫原性和提高的药物动力学。通过本领域公知的技术，例如在分子免疫学 30 卷，16 号，1443~1453，1993 对于人化抗 TNF 抗体叙述的可以制备它们。

术语“抗体”也指包括能够结合抗原的完整分子及其片断如 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub>。Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 片断缺乏显然更快速循环的完整抗体的 Fc 片断，并且可以比完整抗体具有更少的非特异组织结合[Wahl 等人，核酸方法杂志，24：316~325(1983)]。令人满意的是用于本发明的抗体的 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 和其它片断可以根据本发明公开的完整抗体分子的方法检测和定量 IL-18BP 或病毒 IL-18BP。这样的片断通常是通过利用酶如木瓜蛋白酶(产生 Fab 片断)或胰蛋白酶[产生 F(ab')<sub>2</sub> 片断]裂解蛋白质产生的。

如果能够与分子特异反应而将分子结合于抗体，就认为抗体“能够结合”分子。术语“表位”指能够通过也被那个抗体识别的抗体结合的任何分子的部分。表位或“抗原决定簇”通常含有分子如氨基酸或糖侧链的化学活性表面基团并且具有特异的三维结构特征以及特异的电荷特征。

“抗原”是能够通过抗体结合的分子或分子的部分，该抗体另外能够诱导动物产生能够结合抗原的表位的抗体。抗原可以具

有一个或一个以上的表位。特异的反应在上面表示抗原将以高度选择性的方式与它对应的抗体反应而不与大量的其它抗原引起的其它抗体反应。

抗体,包括抗体的片断可用于本发明的定量或定性检测样品中的 IL — 18BP 或病毒 IL — 18BP 或相关蛋白质,或检测表达这样的本发明的蛋白质的细胞的存在。通过利用与光显微镜的,流式细胞计或荧光计的检测偶联的荧光标记的抗体(参见下面)的免疫荧光技术可以完成这一检测。

用于本发明的抗体(或其片断)可以在组织学上如在免疫荧光或免疫电子显微镜中用于本发明的 IL — 18BP 或病毒 IL — 18BP 和相关蛋白质的原位检测。通过从病人中移取组织样品,并且给这样的样品提供本发明的标记抗体可以完成原位检测。通过在生物学样品中应用或覆盖标记抗体(或片断)优选地提供了抗体(或片断)。通过利用这样的方法,不仅确定 IL — 18BP 或病毒 IL — 18BP 或相关蛋白质的存在,而且也可确定它在检测的组织上的分布。利用本发明,那些本领域普通技术人员将容易地发现,为了完成这样的原位检测可以修饰任何种类的组织学方法(如染色方法)。

本发明的 IL — 18BP 或病毒 IL — 18BP, 或相关蛋白质的这样的测试通常包括在存在能够鉴定 IL — 18BP 或相关蛋白质的可检测标记抗体时,温育生物学样品如生物液体,组织提取物,新鲜收集的细胞如淋巴细胞或白细胞,或已经在组织培养中温育的细胞,和通过任何的许多本领域公知的技术检测抗体。利用固相支持物或载体如纤维素,或其它固体支持物或能够固定细胞的载体,细胞颗粒或可溶性蛋白质可以处理生物样品。



标记抗体的酶包括但不限于苹果酸脱氢酶，葡萄球菌核酸酶， $\delta$ -5-类固醇异构酶，酵母乙醇脱氢酶， $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶，磷酸丙糖异构酶，辣根过氧化物酶，碱性磷酸酶，天冬酰胺酶，葡萄糖氧化酶， $\beta$ -半乳糖苷酶，核糖核酸酶，脲酶，触酶，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，葡糖淀粉酶和乙酰胆碱脂酶。通过利用酶的色原底物的比色计方法可以完成检测。在与相似的制备标准的比较中，通过肉眼比较底物的酶反应程度也可以完成检测。

通过任何的其它免疫测试可以完成检测。例如，通过放射性标记抗体或抗体片断，能够通过利用放射性免疫测试(RIA)检测IL-18BP或病毒IL-18BP。在分子生物学中的实验室技术和生物化学，Work, T.S.等人，北荷兰出版公司，纽约(1978)，特定的参考章节的标题是“放射性免疫测试和相关技术的介绍”Chard, T., (引入本发明作为参考)中可以发现对RIA的很好的叙述。当利用 $\gamma$ 计数器或闪烁计数器或通过放射自显影这些手段可以检测放射性的同位素。

利用荧光化合物标记本发明的抗体也是可能的。当荧光标记抗体与适当波长的光接触时，然后由于荧光可以检测它的存在。最通常利用的荧光标记化合物是，异硫氰酸荧光素，罗丹明，藻红蛋白，藻蓝蛋白，别藻蓝蛋白，邻苯二醛和荧光胺。

利用荧光辐射金属如 $^{152}\text{Eu}$ ，或镧系其它物质也可检测地标记抗体。利用如二亚乙基三胺五乙酸(ETPA)的金属螯合基团，可以将这些金属附着于抗体上。

通过将它与生物素偶联也可以检测性地标记抗体。然后，通过与荧光化合物或如过氧化物酶的酶或放射性同位素和诸如此类偶联的抗生物素蛋白或链霉抗生物素可以检测生物素化的抗

体。

通过将它与化学荧光化合物偶联也可以检测地标记抗体。然后通过检测在化学反应过程中产生的荧光的存在确定化学荧光标记的抗体的存在。特定的利用的化学荧光标记化合物的例子是鲁米诺，异鲁米诺，热吡啶酯，咪唑，吡啶盐和草酸酯。

同样，生物荧光化合物也可以用于标记本发明的抗体。生物荧光是在催化蛋白质增强化学荧光反应的效率的生物系统中发现的化学荧光的类型。通过检测荧光的存在确定了生物荧光蛋白质的存在。标记的重要生物荧光化合物是荧光素，荧光素酶和水母发光蛋白。

本发明的抗体分子可以适用于在 immunometric 测试，也已知为“2位点”或“三明治”测试中利用。在典型的 immunometric 测试中，将一定量的未标记的抗体(或抗体片断)结合于固体支持物或载体，并且加入一定量的可检测的标记可溶抗体允许检测和/或定量在固相抗体，抗原和标记的抗体之间形成的三元复合物。

通常，并且优选的，immunometric 测试包括“正向”测试，其中将结合固相上的抗体首先与待测试的样品接触，以便通过形成二元固相抗体-抗原复合物从样品中提取抗原。在适当温育期后，洗涤固体支持物或载体以便除去液体样品的残基包括如果有任何未反应的抗原，然后与含有未知量的标记抗体(作用是“受体分子”)的溶液接触。在允许标记抗体与通过未标记抗体结合于固体支持物或载体的抗原的复合物第二个温育时期后，第二次洗涤固体支持物或载体以便除去未反应的标记抗体。

在也可以用于本发明的抗原的另一类型的“三明治”测试中，利用了所谓的“同时”和“反相”测试。“同时”测试包括单一



的温育步骤，因为抗体结合于同时在待测试的样品中加入的固相支持物或载体和标记的抗体。在温育完成后，洗涤固体支持物或载体以便除去液体样品的残基和未复合的标记抗体。然后，正如它是在常规的“正向”三明治测试，确定了与固体支持物或载体结合的标记抗体的存在。

在“反相”测试中，在利用了适当的温育期之后，首先在液体样品中逐步加入标记抗体的溶液，接着加入结合于固体支持物或载体上的未标记抗体。在第二次温育之后，以常规方式洗涤固相使它脱离待测试的样品的残基和未反应的标记抗体溶液。然后正如在“同时”和“正向”测试中确定结合固体支持物或载体的标记抗体的测试。

正如上面确定的，本发明也提供编码本发明的任何蛋白质的 DNA 分子，含有任何这样的 DNA 分子的可复制表达载体，利用任何这样的表达载体转化的宿主细胞包括原核生物、真核生物和宿主细胞，优选 CHO 细胞。本发明也包括为了在人和其它哺乳动物中表达的目的，产生编码本发明的任何蛋白质的表达载体的方法。

本发明也包括通过培养本发明的转化细胞，和回收 DNA 分子和在这样的转化宿主细胞内的表达载体编码的蛋白质产生本发明的任何蛋白质的方法。

除了在调节 IL — 18 的活性中利用 IL — 18BP 或病毒 IL — 18BP，当然它们也可以用于纯化 IL — 18BP 本身。为了这一目的，将 IL — 18BP 或病毒 IL — 18BP 与亲和柱偶联，并且通过粗 IL — 18。然后，通过例如在低 pH 洗脱从柱回收 IL — 18。

通过下面的非限制性实施例可以说明本发明：

### 实施例 1：分离 IL-18 结合蛋白

根据制造商的说明,将大肠杆菌 IL-18(2.5 毫升, Peprtech, NJ)与亲和凝胶-10(0.5 毫升, BioRad)偶联, 填充进入柱中。以流速 0.25 毫升/分钟, 将粗尿蛋白质(100 倍浓缩, 500 毫升)加载到柱上。利用 250 毫升磷酸缓冲液(PBS)中的 0.5 摩尔/升的 NaCl 洗涤柱。然后立即用 1 摩尔/升  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  中和的 25 毫摩尔/升柠檬酸, pH2.2 和苯甲脒(1 毫摩尔/升)洗脱结合的蛋白质。收集 1 摩尔/升的部分。通过 SDS-PAGE 分析各部分, 并且银染。在组份 2~8 中, IL-18 结合蛋白质作为约 40,000 道尔顿蛋白质洗脱(图 1)。对应于 IL-18BP 的约 40 千道尔顿的带在银染时展示明显的黄色。通过正如实施例 2 中所述与  $^{125}\text{I}$ -IL-18 交联, SDS-PAGE 和放射自显影分析各种部分。在组份 2~8 发现 IL-18 结合蛋白质, 从 IL-18 琼脂糖柱洗脱(图 2)。

### 实施例 2：亲和纯化的 IL-18BP 与标记的 IL-18 的交联

将来自亲和纯化步骤的 IL-18BP 的样品(40 微升)与  $^{125}\text{I}$ -IL-18(5,000,000cpm)一起温育(70 分钟,  $4^\circ\text{C}$ )。然后加入溶解于二甲基亚砜( $\text{Me}_2\text{SO}$ , 20 毫摩尔/升)的 disuccinimidyl suberate(DSS)到最后浓度为 2 毫摩尔/升, 并且将混合物在  $4^\circ\text{C}$  保留 20 分钟。通过加入 pH7.5 的 1 摩尔/升 Tris-HCl 和 1 摩尔/升 NaCl 到最后浓度为 100 毫摩尔/升终止反应。加入含有二硫苏糖醇(DTT, 25 毫摩尔/升最后)的样品缓冲液, 通过 SDS-PAGE(7.5 丙烯酰胺)接着放射自显影分析混合物(图 2)。

在从 IL-18 亲和柱(道 2 和 3)洗脱的部分, 但在含有所有其它粗尿蛋白质的柱洗液(道 1)中观察到了可能含有与约 20

千道尔顿  $^{125}\text{I}$  — IL — 18 交联的约 40 千道尔顿蛋白质的分子量为 58 千道尔顿的特异带。

### 实施例 3: 蛋白质序列分析

在非还原条件下, 通过 SDS — PAGE(10% 丙烯酰胺) 分辨实施例 1 的亲合柱洗脱的各部分, 在 PVDF 膜(Pro-Blot, 应用生物系统, USA) 上电泳印。利用考马斯蓝染色膜, 切出约 40 千道尔顿的带, 通过 Procise 微序列仪(应用生物系统, USA) 进行蛋白质序列分析。获得下面大的序列:

T — P — V — S — Q — Q — x — x — x — A — A — A  
1        .        .        .        5        .        .        .        10        .        .

其中 x 代表尚未确定的氨基酸。

另外, 获得了小的序列:

A — x — Y — x — R — I — P — A — x — A — I — A  
1        .        .        .        5        .        .        .        10        .        .

因为这一双倍体序列, 不可能获得更长的序列数据。鉴定了小序列为人防卫素的片断(登记号 p11398), 开始在防卫素的氨基酸 65。大序列不能与任何其它已知的蛋白质结合, 正如通过 blastp 和 tblastn 研究程序研究 NCBI 和 TIGR 中所有可得数据库确定的。

为了获得更长和更精确的序列, 和为了鉴定潜在的半胱氨酸残基, 在 6 摩尔/升盐酸胍中利用 DTT 还原从 IL — 18 琼脂糖柱洗脱的组份的另一个等分试样, 与 4 丙烯吡啶反应, 通过微超滤装置(Ultrafree, 截止分子量 10,000 道尔顿, Millipore) 脱盐, 进行蛋白质微序列的分析。在测序的 1 号循环后, 将滤纸与邻苯二

醛反应封闭 N 末端多肽而不是 Pro。以这一方式，仅获得如下大序列：

TPVSQXXXAA XASVRSTKDP CPSQPPVFPA AKQCPALEVT

1 10 20 30 40

(T=Thr; P=Pro; V=Val; S=Ser; Q=Gln; X=未知; A=Ala; R=Arg; K=Lys; D=Asp; C=Cys; F=Phe; L=Leu; E=Glu)

在循环 6, 7, 8 和 11 中，获得了低水平的 Thr 信号。因为这一低水平，我们认为在所述的循环中不指派特定的氨基酸残基是更加谨慎的。

正如研究蛋白质数据库确定的，得到的序列明显不同于任何其它已知蛋白质。但是，通过 tblastn 研究程序研究 TIGR 数据库提供了 cDNA 文档，称为 THC123801，它的开放读码框架(218 个密码子)当翻译时，含有与 IL-18BP 的 N 末端序列高度同源的序列。下面显示了同源性：

```
1 .....TPVSQXXXAAXASVRSTKDPCPSQPPVFPAAKQCPALEVT... 40
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
51 VTLVLRATXVXQTTTAATASVRSTKDPCPSQPPVFPAAKQCPALEVTWPE 100
```

[上面的序列(1~40)是本发明分离的 IL-18BP；下面的序列(51~100)是通过 TIGR 文档 THC123801 的 cDNA 的翻译推断的]。

在 IL-18BP 的残基 2 和 4，翻译文档 THC123801 获得的推定的蛋白质序列是模糊的。它证明了 IL-18BP 的氨基酸残基 6, 7 和 8 作为 Thr 的特征，并且似乎对残基 11 也一样。

实施例 4：IL-18BP 是糖蛋白

通过在 Superose 12 柱(1 x 30 厘米, Pharmacia, 瑞典)上排斥大小层析进一步纯化实施例 1 中洗脱组份的等分试样(0.3 毫升)。预平衡柱, 并且利用磷酸缓冲液和叠氮化钠(0.02%)流速 0.5 毫升/分钟洗脱。1 分钟收集组份。正如 SDS — PAGE 和银染确定的, 在组份 20~25 作为约 40,000 道尔顿的蛋白质洗脱 IL — 18BP 结合蛋白质。根据制造商的说明, 将含有约 40,000 道尔顿的蛋白质的样品(23, 50 微升组份, 约 50 纳克蛋白质)与 N 糖苷酶 F(PNGase F, Biolab)反应。简言之, 通过在 5%SDS 煮沸 10 分钟, 10 x G7 缓冲液(2.5 微升), 10%NP — 40(2.5 微升), 和 PNGase F(1 微升)在 37 °C 1 小时变性等分试样。在非还原条件下通过 SDS — PAGE(10%丙烯酰胺)分析样品, 并且与来自相同的 Superose12 柱的未消化的 IL — 18BP 比较。发现在 PNGase-处理的部分, 约 40 千道尔顿的 IL — 18BP 带消失了。获得了新的对应于 30 千道尔顿(正如在 PNGase 带上面)和 20 千道尔顿的带。约 40 千道尔顿的带的消失表明该带是 N 糖基化蛋白质。

#### 实施例 5: 通过 IL — 18BP 封闭 IL — 18 的生物活性

通过测量在单核细胞中 IL — 18 诱导的 IFN —  $\gamma$  的产生确定从尿中分离的 IL — 18BP 封闭 IL — 18 活性的能力。当与低浓度的 LPS, IL — 12, IL — 2 或其它刺激物一起加入时, IL — 18 诱导 IFN —  $\gamma$ 。在小鼠脾细胞, 在人周边血液单核细胞(PBMC)和在人 KG — 1 细胞系中测试 IL — 18 的活性。从健康的小鼠制备脾细胞, 洗涤和在补充了 10%胎牛血清的 RPMI1640 中以  $5 \times 10^6$  细胞/毫升悬浮。利用 LPS(0.5 微克/毫升或 1 微克/毫升)以及重组人或小鼠 IL — 18(0.5 纳克/毫升或 5 纳克/毫升)刺激 1.0 毫

升培养物。在加入脾细胞之前，在重组 IL-18 中加入人 IL-18 结合蛋白质(0, 5 或 50 纳克/毫升)。在培养 24 小时后，将脾细胞进行三次冷冻(-70℃)和解冻(室温)循环，通过离心除去细胞碎片，对于小鼠 IFN- $\gamma$ (内源)，利用 ELISA 试剂盒测试上清液的 IFN- $\gamma$ 。正如图 3A 所示，IL-18BP 以依赖剂量的方式，封闭小鼠脾细胞中的 huIL-18 的活性。相反，作为对照，可溶性的干扰素- $\alpha/\beta$  受体没有效果。重组小鼠 IL-18 的活性相似地受到人 IL-18BP 的抑制，表明人 IL-18BP 识别小鼠 IL-18(图 3B)。通过高浓度的 LPS 在小鼠脾细胞中诱导内源的 IL-18，导致 IFN- $\gamma$  的产生。实际上，尿 IL-18BP 也抑制 LPS(10 微克/毫升)诱导 IFN- $\gamma$ (图 3C)。伴刀豆球蛋白 A(con A)活化 T 细胞以便在缺乏 IL-18 时产生 IFN- $\gamma$ (13)。确实，IL-18BP 甚至在高浓度不抑制 Con A 诱导 IFN- $\gamma$ (图 3D)。这一观察证明了 IL-18BP 是 IL-18 生物活性的特异抑制剂而不是 IFN- $\gamma$  产生的非特异抑制剂。IL-18BP 也抑制了 IL-18 和 TNF- $\alpha$  的联合诱导的人 KG-1 细胞中人 IL-18 的活性(图 3E)。

正如在人和小鼠单核细胞中 IFN- $\gamma$  的共诱导确定的，上面的数据证明了尿 IL-18BP 抑制人以及小鼠 IL-18 的活性。减弱 IL-18 活性>90%的 IL-18BP 的浓度是可以与 IL-18 本身比较的，表明在这两个蛋白质之间的高亲和相互作用。

#### 实施例 6：编码 IL-18BP 的 cDNA 克隆的分离

利用 SuperScript RNase H 逆转录酶(Gibco-BRL)和随机引物(Promega, 麦迪生 WI)逆转录来自 Jurkat T 细胞(CRL 8163, 美国类型培养物收藏中心)的总 RNA。然后，通过 PCR，利用 Taq

DNA 聚合酶(西格玛)和对应于 TIGR 克隆 THC123801 核苷酸 24~44(有意义)和 500~481(反义)的引物扩增得到的 cDNA 片断。在 30 个退火(55 °C, 2 分钟)和扩展(70 °C, 1 分钟)循环中进行扩增。通过琼脂糖(1%)凝胶电泳分辨 PCR 产物, 洗脱和克隆进入 pGEM-Teasy TA 克隆载体(Promega)。利用 T7 和 SP6 引物测序来自单个克隆的 DNA。

通过随机引导  $^{32}\text{P}$  标记得到的 477bp 片断。将这一探针用于筛选各种人 cDNA 和基因组文库。取出复制的硝酸纤维素滤纸, 并且与探针在 60 °C, 在含有 6 x SSC, 10 x Denhardt's 溶液, 0.1% SDS 和 100 微克/毫升鲑精 DNA 的缓冲液中杂交。洗涤滤纸和在一 80 °C 过夜曝光到 Kodak XAR 胶片上。菌斑纯化双倍阳性克隆。从  $\lambda$ pCEV9 克隆切出质粒, 并且自身连接。根据制造商的说明分离来自其它文库的 cDNA 克隆。利用有意义和反义引物和 373A 和 377 序列仪(应用生物系统)进行分离的克隆的自动 DNA 序列分析(33)。这些克隆程序使用标准方案。

筛选下面的文库: T.Miki 友好提供的,  $\lambda$ pCEV9 克隆载体(15)中构建的人单核细胞 cDNA 文库; 人 Jurkat 白血病 T 细胞 cDNA 文库, 人周边血液白细胞 cDNA 文库, 和人脾 cDNA 文库, 所有来自 Clontech(Palo Alto, CA)。在  $\lambda$ FIX II 载体中的人胎盘基因组文库是来自 Stratagene(La Jolla, CA)。

获得和鉴定了对应于四个不同的 IL-18BP 拼接变异体的所有 cDNA 克隆。所有拼接的变异体编码推定的可溶性分泌蛋白质。最丰富的一个(IL-18BP<sub>a</sub>)具有 192 个密码子的开放读码框架, 编码了 28 个氨基酸残基的信号肽, 接着成熟的推定的 IL-18BP<sub>a</sub>, 它的开始 40 个残基(SEQ ID NO:10)完美地匹配了尿 IL-

18BP(SEQ ID NO:2)的 N 末端蛋白质序列。半胱氨酸残基的位置表明了这一多肽属于免疫球蛋白(Ig)超家族。在成熟 IL-18BPa 内的四个 Gln 残基的每一个都是潜在的 N 糖基化位点。IL-18BP 的其它三个拼接变异体明显更不丰富。

另一个 1kb IL-18BPb cDNA 编码 85 个氨基酸残基的成熟蛋白质(SEQ ID NO:4)。编码 169 个氨基酸残基(SEQ ID NO:6)的成熟 IL-18BP 的 2.3kb cDNA 表示第三个变异体 IL-18BPc。第四个变异体, IL-18BPd 编码 133 个氨基酸残基的成熟 IL-18BP(SEQ ID NO:8)。外显子内的拼接存在于沿着前 mRNA 的两个位点。这些事件和在 IL-18BPd 中的另外的 5'外显子在各种 cDNA 克隆中产生 3 个不同的 5'UTR。所以, 应答不同的转录调节信号有可能产生不同的 IL-18BP 变异体。

迄今为止, 没有发现编码含有跨膜区的受体的 cDNA。

#### 实施例 7: 哺乳动物表达载体的构建, 重组 IL-18BP 的产生和重组 IL-18BP 的生物活性的评估

通过 PCR, 利用有意义引物 5'TATATCTAGAGCCACCATGA GACACA ACTGGACACCA 和反义引物: 5'ATATCTAGATTAAT GATGATGATGATGATGACCCTGCTGCTGTGGACTGC 扩增 IL-18BPa cDNA 的编码区。利用 Xba I 裂解 PCR 产物, 克隆进入 pEF-BOS 表达载体(25)的 Xba I 位点以便产生 pEF-BOS-IL-18BPa。通过 DNA 测序证明了构建体。

在室温下, 如所述(35)温育含有 pEF-BOS-IL-18BPa 质粒 DNA(10 微克)和 DEAE-葡聚糖(120 微克)的 1.4 毫升 TD 缓冲液中的  $6 \times 10^7$  个 COS7 细胞 30 分钟。然后, 利用 DMEM-10%FBS



洗涤细胞，在 DMEM — 10 中涂布 4 小时，洗涤和在无血清的 DMEM 中温育 3~5 天。收集培养基，通过超滤(10 千道尔顿截止分子量)浓缩 6 倍并且在 Talon 柱(Clontech)上。利用咪唑作为洗脱剂，根据制造商的说明分离 IL — 18BP — His<sub>6</sub>。

如下评估尿和 COS7 表达的 IL — 18BP 的免疫交联反应性：将利用 <sup>125</sup>I 通过氯胺 T 方法标记尿 IL — 18BP(5 微克)。将 COS7 细胞的上清液(250 微升)与尿 IL — 18BP 的抗体混合(1 小时，室温，最后体积 500 微升)，在磷酸缓冲盐(PBS)，0.05%吐温 20 和 0.5%牛血清白蛋白(洗涤缓冲液)中稀释 1:1000。然后加入 <sup>125</sup>I 标记的尿 IL — 18BP(10<sup>6</sup> cpm)，在 1 小时后，加入蛋白质 G — 琼脂糖(20 微升)。将混合物悬浮(1.5 小时，4 °C)，然后分离小珠，在 3x 洗涤缓冲液中洗涤，再次利用 PBS 洗涤。然后利用样品缓冲液洗脱小珠，通过 SDS — PAGE 分辨(10%丙烯酰胺，在还原条件下，接着放射自显影)。

在还原条件下和非还原条件下利用银染，IL — 18BP 跑成单一的带，并且具有如尿 IL — 18BP 相同表观分子量(数据未显示)。这一制剂的蛋白质序列分析表明如尿 IL — 18BP 相同的 N 末端的序列，表明后者不在 N 末端降解。

利用抗尿 IL — 18BP 的抗体免疫影印分析 IL — 18BP<sub>a</sub> 表明与尿蛋白质具有相同的分子量。另外，利用免疫沉淀，接着 SDS — PAGE 和放射自显影，IL — 18BP<sub>a</sub> 能够替代尿 <sup>125</sup>I — IL — 18BP 结合抗体。所以，IL — 18BP<sub>a</sub> 在结构上对应于尿 IL — 18BP。

测试粗和纯化的 IL — 18BP<sub>a</sub> 抑制 IL — 18 的生物活性的能力。IL — 18BP<sub>a</sub> 以依赖剂量的方式抑制 IFN — γ 在小鼠脾细胞，

PBMC 和人 KG-1 细胞系中诱导人和小鼠 IL-18 的活性(图 9)。

各种生物测试以及迁移变换测试的结果(实施例 8)证实抑制 IL-18 活性的是克隆的 IL-18BP, 不是尿 IL-18BP 的任何附带不纯物质, 如其洗脱的防卫素片断的内在特性。

#### 实施例 8: 电泳迁移变换测试

同时研究了尿和重组 IL-18BP 对在人 KG-1 细胞中 IL-18 诱导的 NF- $\kappa$ B 的活性的影响。利用 huIL-18(10 纳克/毫升)或与 IL-18BP 预混合的 huIL-18 刺激人 KG-1 细胞( $4 \times 10^6$ , 在 1 毫升 RPMI 中)(20 分钟, 室温)。在  $37^\circ\text{C}$  20 分钟后, 利用冰冷的 PBS 洗涤三次, 立即在液氮中冷冻。将细胞碎片再悬浮在缓冲液 A[20 毫摩尔/升 Tris pH7.6, 0.4 摩尔/升 NaCl, 0.2 毫摩尔/升 EDTA, 甘油(20% 体积), 1.5 毫摩尔/升  $\text{MgCl}_2$ , 2 毫摩尔/升二硫苏糖醇(DTT), 0.4 毫摩尔/升 PMSF, 1 毫摩尔/升  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 2 微克/毫升每种亮抑酶肽, 抑胃酶肽, 和抑酶肽]中的 3 倍紧密细胞体积中。通过离心除去细胞碎片( $15,000 \times g$ , 15 分钟)。在液氮中冷冻上清液的等分试样, 并且储藏在  $-80^\circ\text{C}$ 。利用小牛血清白蛋白作为标准通过 Bradford 测试(Bio-Rad)确定蛋白质浓度。利用 [ $^{32}\text{P}$ ]dCTP(300 居里/毫摩尔)和 T4 聚核苷酸激酶(新英格兰实验室)标记对应于 NF- $\kappa$ B 结合元素的双链寡核苷酸(10 皮摩尔, 普鲁美格)。通过旋转柱除去游离的核苷酸。将利用 IL-18 或 IL-18 + IL-18BP 处理的细胞的提取物(10 微克蛋白质)与标记探针( $3 \times 10^4 \text{cpm}$ )以及聚 dI.dC(500 纳克, Pharmacia)一起温育(15 分钟, 室温)并且在 20 微升含有 HEPES(pH7.5, 10 毫摩尔/升), 60 毫摩尔/升 KCl, 1 毫摩尔/升

MgCl<sub>2</sub>, 2 毫摩尔/升 EDTA, 1 毫摩尔/升 DTT 和甘油 (5% 体积) 的缓冲液中变性鲑精 DNA (100 纳克, 西格玛)。然后, 在 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上加载混合物。在 185V, 在 0.5 x TBE (40 毫摩尔/升 Tris HCl, 45 毫摩尔/升 硼酸, 和 2.5 毫摩尔/升 EDTA) 中进行电泳。真空干燥凝胶并且在 -80 °C 过夜放射自显影。发现 IL-18 诱导 p50-NF-κB 同源二聚体和 p65/p50 NF-κB 异源二聚体的形成。正如利用结合对应于 NF-κB 同感序列的放射性标记的寡核苷酸的 KG-1 细胞提取物的电泳迁移变换测试确定的, 尿以及重组 IL-18BP 通过 IL-18 抑制 NF-κB 的活化。

#### 实施例 9: 在大肠杆菌, 酵母和昆虫细胞中表达 IL-18BP

通过其它重组细胞如原核生物细胞例如大肠杆菌或其它真核生物细胞如酵母和昆虫细胞也可以产生 IL-18BP。构建适当的携带编码 IL-18BP 的 DNA 和适于转化大肠杆菌和酵母细胞或感染昆虫细胞的载体以便产生重组 IL-18BP 的已知方法是可得的。为了在酵母细胞中表达, 切出编码 IL-18BP 的 DNA (实施例 6) 并且插入适于转染酵母细胞的表达载体。为了在昆虫细胞中表达, 将编码 IL-18BP 的 DNA 插入杆状病毒, 并且利用所述的重组杆状病毒感染昆虫细胞。为了在大肠杆菌中表达, 将编码 IL-18BP 的 DNA 利用适当的寡核苷酸进行定位诱变, 以致将起始的 ATG 密码子刚刚插入在成熟的 IL-18BP 的第一个密码子之前。可替代地, 通过 PCR, 利用适当的有意义和反义引物可以制备这样的 DNA。然后, 将得到的 cDNA 构建体通过本领域公知的技术插入在适当构建的原核表达载体 (23)。

### 实施例 10：构建体内表达 IL — 18BP $\alpha$ 的腺结合表达载体

根据质粒 pcDNA3 构建编码 IL — 18BP $\alpha$  的功能基因 (Invitrogen, 圣迭戈, CA)。将在 5' 末端含有 Kozak 同感序列的 IL — 18BP cDNA 以破坏限制位点的方式连接进入 pcDNA3 的 Xba I 位点。在新霉素盒 (原始 pcDNA3 序列的碱基 2151) 之前和在 SV40 多聚腺苷酸化信号 (原始 pcDNA3 序列的碱基 3372) 之后, 通过定位诱变插入新的 Xba I 位点。然后利用 Xba I 裂解构建体, 并且将得到的 4.7kb 小基因如上所述插入在质粒 psub201 的 Xba I 位点 (Snyder 等人, 1996, 人遗传学中的当前方案, 12.1.1~12.1.17 章, John Wiley 和 Sons)。利用辅助 AAV 质粒 pAAV/Ad 将得到的重组质粒共转染进入人 T293 细胞。然后, 利用腺病毒作为辅助病毒感染培养物, 在温育 48~60 小时后收集细胞。将细胞进行 3 个冷冻—解冻循环, 通过离心除去细胞碎片, 利用硫酸铵将上清液饱和 33%。然后离心混合物, 通过将硫酸铵饱和 50% 从上清液中沉淀 rAAV。通过 CsCl 进一步纯化该病毒, 在 56℃ 最后加热 15 分钟以便破坏任何腺病毒。

### 实施例 11：构建 IL — 18BP 的重组融合蛋白质

如下可以进行含有与 IgG2 重链的恒定区融合的 IL — 18BP 的蛋白质的生产：利用适当的寡核苷酸将 IL — 18BP 的 DNA 进行定位诱变, 以致在编码序列之前和之后立即导入独特的限制位点。将含有 IgG2 重链的恒定区的质粒, 例如 pRKCO42FcI(6) 进行相同的定位诱变以便在尽可能接近 IgG1 重链的 Asp 216 处以允许在融合蛋白质的时期中翻译的方式导入相同的独特位点。通过在独特的限制位点消化, 或可替代地通过利用适当设计的引物

的 PCR 可以制备含有 5' 非翻译序列和编码 IL-18BP 的 dsDNA 片断。相似地消化突变的 pRKCD42Fc1 产生含有质粒和 IgG1 序列的大片断。然后, 将两个片断连接产生编码含有 IL-18BP 和 IgG 重链的约 227 个 C 末端氨基酸(铰链区和 CH2 和 CH3 区)的多肽的前体的新质粒。可以利用适当的限制酶通过消化从质粒中分离编码融合蛋白质的 DNA, 然后插入有效的原核或真核表达载体。

#### 实施例 12: 生产化学修饰的 IL-18BP

为了增强质粒中 IL-18BP 的半衰期, 可以制造利用聚乙二醇(PEG)化学修饰的 IL-18BP。通过将 PEG 与 IL-18BP 分子的半胱氨酸残基交联可以进行修饰。可以构建含有 IL-18BP 的氨基末端的外半胱氨酸残基, 糖基化位点, 羧基末端的突变体 IL-18BP。通过利用含有需要的突变的寡核苷酸的 PCR 可以进行诱变。以本领域公知的常用方法表达这些突变蛋白质。将进行这些蛋白质的 Pegylation 并且将评估活性。

#### 实施例 13: 制备抗 IL-18BP 的多克隆抗体

利用在完全 Freund 佐剂中乳化的 5 微克尿 IL-18BP 的纯净制剂皮下开始皮下注射兔。3 星期后, 利用 5 微克在不完全 Freund 佐剂中的 IL-18BP 制剂皮下再次注射它们。在 10 天的间隔给予另外两次注射正如在 PBS 中的溶液的 IL-18BP。在最后免疫后 10 天取兔血。在发展抗体水平后进行放射免疫测试。将  $^{125}\text{I}$  标记的 IL-18BP(166,000cpm)与各种稀释度(1:50, 1:500, 1:5,000 和 1:50,000)的兔血清混合。在总体积 200

微升中加入蛋白质—G琼脂糖小珠的悬浮液(20微升, Pharmacia)。在室温保留混合物1小时,然后洗涤小珠三次,计数结合的放射活性。将人 leptin 的兔抗血清用作阴性对照。IL—18R的抗血清的效价是在1:500和1:5,000之间,而阴性对照的效价小于1:50。

#### 实施例 14: 制备 IL—18BP 的单克隆抗体

首先利用在完全 Freund 佐剂的乳液中的2微克纯化的 IL—18BP 注射雌性 Balb/C 小鼠(3个月大),并且3个星期后,在不完全 Freund 佐剂中皮下注射。在10天的间隔,在 PBS 中皮下给予另外三次注射。在融合之前4和3天给予正如 IRIA(参见如下)确定的显示最高结合效价的小鼠腹膜内最后加强免疫。利用 NSO/1 黑色素瘤细胞系和作为融合参与者的从动物的脾和淋巴结制备的淋巴细胞进行融合。在微培养平板中分配融合细胞,在补充 HAT 和 15%马血清的 DMEM 中选择杂交瘤。将发现产生 IL—18BP 的抗体的杂交瘤通过限制稀释亚克隆,并且注射进入已经利用降植烷引导产生腹水的 Balb/C 小鼠。利用市场可得的 ELISA 试剂盒确定抗体的同型(Amersham, 英国)。

如下进行产生抗 IL—18BP 的单克隆抗体的杂交瘤的筛选: 通过反向固相放射性免疫测试(IRIA)测试杂交瘤上清液中抗 IL—18BP 抗体的存在。利用 Talon-纯化的 IL—18BP<sub>a</sub>-His<sub>6</sub>(10微克/毫升, 100微升/孔)包衣 ELISA 平板(Dynatech 实验室, Alexandria, VA)。在4℃温育过夜后,利用含有 BSA(0.5%)和吐温 20(0.05%)的 PBS 洗涤平板两次,在洗涤溶液在37℃封闭至少2小时。加入杂交瘤培养上清液(100微升/孔)并且在37℃

温育平板 4 小时。洗涤平板三次，在室温下在 2 小时加入山羊抗小鼠辣根过氧化物酶共轭物(HRP, Jackson 实验室, 1:10,000, 100 微升/孔)。洗涤平板四次，通过作为底物的含有  $H_2O_2$  的 ABTS[2',2'-连氨基-双(3-乙基苯噻唑-6-磺酸; 西格玛)]展色。通过自动 ELISA 读数器对平板读数。认为至少比阴性对照的值高 5 倍的读数的样品是阳性的。

#### 实施例 15：利用单克隆抗体亲和层析 IL-18BP

通过亲和层析将抗 IL-18BP 的抗体用于 IL-18BP 的纯化。在 50% 饱和度沉淀硫酸铵，接着对 PBS 扩展透析纯化杂交瘤分泌的含有单克隆抗体的腹水液体。正如制造商特指的，将约 10 毫克免疫球蛋白结合于 1 毫升亲和凝胶 10(BioRad USA)。

在 4 °C，流速 0.25 毫升/分钟在 0.5 毫升抗 IL-18BP 抗体柱上加载 250 毫升人尿蛋白质(相当于 250 升粗尿)。利用 PBS 洗涤柱直到在洗液中检测不到蛋白质。利用 25 毫摩尔/升柠檬酸缓冲液，pH 2.2(8 x 1 柱体积部分)洗脱 IL-18BP，通过 1 摩尔/升  $Na_2CO_3$  立即中和。通过大小排除层析获得这一制剂的进一步的纯化。

#### 实施例 16：ELISA 测试

利用抗 IL-18BP 单克隆抗体(无血清杂交瘤上清液或腹水免疫球蛋白)在 4 °C 过夜包衣微滴平板(Dynatech 或 Maxisorb, Nunc)。利用含有 BSA(0.5%)和吐温 20(0.05%)的 PBS 洗涤平板，在 37 °C 在同样的溶液中至少封闭 2 小时。在封闭溶液中稀释测试样品，在 37 °C 加入孔中(100 微升/孔)4 小时。然后，

利用含有吐温 20(0.05%)的 PBS 洗涤平板三次,接着加入兔抗 IL-18BP 血清(1:1,000, 100 微升/孔)在 4 °C 进一步温育过夜。洗涤平板三次,并且在室温,在 2 小时加入山羊抗兔辣根过氧化物酶的共轭物(HRP, Jackson 实验室, 1:10,000, 100 微升/孔)。洗涤平板四次,通过含有 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的作为底物的 ABTS[2',2'-连氨基-双(3-乙基苯噻唑-6 磺酸, 西格玛)]展色。通过自动 ELISA 读数器对平板读数。

#### 实施例 17: 非糖基化人 IL-18BP 是具有生物活性的

测试纯化的重组 IL-18BP 的抑制 IL-18 的生物活性的能力。IL-18BP 以依赖于剂量的方式抑制在小鼠脾细胞, PBMC 和人 KG-1 细胞系中 IFN- $\gamma$  诱导人和小鼠 IL-18 的活性。

将在 C 末端具有 His<sub>6</sub> 标记的纯化 IL-18BP(1.5 微克, 50 微升)的 pH 调节到 7.5, 并且与 N 糖苷酶 F(3 微升, 500,000 单位/毫升, PNGase F, 新英格兰实验室)混合。在 37 °C, 在非变性条件下温育混合物 24 小时。通过非还原条件下, SDS-PAGE, 接着利用 IL-18BP 的抗体免疫影印分析来自样品和来自未消化 IL-18BP-His<sub>6</sub> 的等分试样。发现 IL-18BP-His<sub>6</sub> 的约 40 千道尔顿的带在 PNGase 处理的组份中消失, 获得了新的约 20 千道尔顿的带。PNGase F 的产物的分子量和特异性表明 IL-18BP-His<sub>6</sub> 完全糖基化。

在 Talon 小珠上分别吸收缓冲液中的 PNGase 处理的组份, 未消化的 IL-18BP-His<sub>6</sub> 和含有 PNGase 的对照样品, 利用磷酸缓冲液洗涤, 利用咪唑(100 毫摩尔/升)洗脱。利用人 IL-18



18(20 纳克/毫升), LPS(2 微克/毫升)和小鼠脾细胞将洗脱组份进行生物测试。在下面的表中显示了结果:

样品	IFN- $\gamma$ ng/ml(纳克/毫升)
对照	7.5
非消化 IL — 18BP — His <sub>6</sub>	0
PNGase 处理的 IL — 18BP — His <sub>6</sub>	0

所以, 结论是糖基化的 IL — 18BP 作为 IL — 18 活性的调节物是具有生物活性的。

前面的特异实施例的叙述表明本发明的一般特性, 以致通过应用当前的知识, 其它人可以容易地修饰和/或采用各种应用, 如不脱离一般概念的特异实施例, 并且, 这样的采用过程和修饰应该可理解为在本实施例的等当实施例的一样和范围内。需要理解的是本发明利用的表达方式或术语是用于叙述而不是限制。

### 参考文献

1. Anderson, D.M. 等人, TNF 受体的同系物和它的配体增强 T 细胞生长和树状细胞功能, 自然, 1997.390(6656): 175~179 页。
2. Bollon, D.P. 等人 (1980) 临床血液癌症学杂志, 10 : 39~48。
3. Botstein, D. 等人, (1982) Miami Wint. Symp. 19 : 265~274。
4. Broach, J.R., “啤酒酵母的分子生物学: 生命周期和遗传” 科尔德斯普林港实验室, 科尔德斯普林港, 纽约, 445~470(1981)。
5. Broach, J.R., (1982) 细胞 28 : 203~204。
6. Byrn R.A. 等人, 1990, 自然(伦敦)344 : 667~670。
7. Car, B.D., V.M. Eng, B. Schnyder, L. Ozmen, S. Huang, P. Gal lay, D. Heumann, M. Aguet 和 B. Ryffel. 1994. 干扰素 $\gamma$ 受体缺陷的小鼠是抗内毒素休克的, 实验方法杂志, 179 : 1437~44 issn:0022-1007。
8. Chater, K.F. 等人, 在“第六次放线菌生物学的国际专题研讨会”, Akademiai Kaido, 布达佩斯, 匈牙利(1986), 45~54 页。
9. Conti, B., J.W. Jahng, C. Tinti, J.H. Son, 和 T.H. Joh. 1997, 在肾上腺皮质中干扰素 $\gamma$ 诱导因子的诱导, 生物化学杂志, 272 : 2035~2037。
10. Dao, T., K. Ohashi, T. Kayano, M. Kurimoto, 和 H. Okamura. 1996, 干扰素 $\gamma$ 诱导因子, 新细胞因子, 增强小鼠 T 辅助 1 细胞的

Fas 配体介导的细胞毒性。细胞免疫学, 173 : 230~5  
issn:0008~8749。

11.Engelmann,H.,D.Aderka,M.Rubinstein,D.Rotman, 和  
D.Wallach.1989.从人尿纯化肿瘤坏死因子结合蛋白质到均一保  
护了细胞不受肿瘤坏死因子毒性的影响,生物化学杂志, 264 :  
11974~11980。

12.Engelmann,H.,D.Novick, 和 D.Wallach.1990,从人尿纯  
化的两个肿瘤坏死因子结合蛋白质。与细胞表面肿瘤坏死因子受  
体的免疫学交联反应性的证据,生物化学杂志, 265 :  
1531~1536。

13.Fantuzzi,G.等人,正如在白细胞介素 1b 转化酶缺陷小鼠  
中表明, IL — 18 调节 IFN — g 产生和细胞增殖。血液, 1998 ,  
91 : 2118~2125。

14.Gryczan,T,“芽胞杆菌的分子生物学”学术出版社,纽  
约,(1982), 307~329。

15.Gutkind,J.S.等人,用于 Epstein-Barr 病毒感染的 B 淋巴  
细胞而不是正常的单核细胞的新 c-fgr 外显子。分子细胞生物学,  
1991, 11 : 1500~1507。

16.Heremans,H.,J.Van Damme,C.Dillen,R.Dijkmans, 和  
A.Billiau.1990.干扰素  $\gamma$ , 在小鼠中致死脂多糖诱导的  
Shwartzman 状休克反应的介导体,实验方法杂志, 171 :  
1853~69 issn:0022~1007。

17.Izaki,K.(1978)日本细菌学杂志, 33 : 729~742。

18.John,J.F.等人(1986)感染疾病综述, 8 : 693~704。

19.Kendall,K.J. 等人 (1987), 细菌学杂志, 169 :

4177~4183。

20. Kohno, K., J. Kataoka, T. Ohtsuki, Y. Suemoto, I. Okamoto, M. Usui, M. Ikeda, 和 M. Kurimoto. 1997. 在 Th1 而不是 Th2 细胞的活化中 IFN- $\gamma$  诱导的因子 (IGIF) 是协同刺激因子, 并且独立于 IL-12 发挥它的影响, 免疫学杂志, 158: 1541~1550。

21. Maliszewski, C.R., T.A. Sato, T. Vanden Bos, S. Waugh, S. K. Dower, J. Slack, M.P. Beckmann, 和 K.H. Grabstein. 1990. 细胞因子受体和 B 细胞功能 I 重组可溶受体特异地抑制 IL-1 和 IL-4 体外诱导 B 细胞活性, 免疫学杂志, 144: 3028~3033。

22. Maniatis, T., 在“细胞生物学: 综合性论文, 3 卷, 基因表达”, 学术出版社, 纽约, 563~608(1980)。

23. Maniatis 等人, 分子克隆: 实验室手册, 科尔德斯普林港实验室, 纽约, 1982。

24. Micallef, M.J., T. Ohtsuki, K. Kohno, F. Tanabe, S. Ushio, M. Namba, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, S. Fukuda, 和 M. Kurimoto. 1996. 通过刺激人 T 细胞, 干扰素  $\gamma$  诱导的因子增强 T 辅助 1 细胞因子的生产: 与干扰素 12 协同作用于干扰素  $\gamma$  生产。当前免疫学杂志, 26: 1647~51 issn: 0014~2980。

25. Mizushima, S. 和 Nagata, S. (1990), pEF-BOS, 强有力的哺乳动物表达载体, 核酸综述, 18: 5322~5328。

26. Nakamura, K., H. Okamura, K. Nagata, T. Komatsu, 和 T. Tamura. 1993. 提供  $\gamma$  干扰素生产协同刺激信号的因子的纯化, 感染免疫学 61: 64~70 issn: 0019~9567。

27. Nakamura, K., H. Okamura, M. Wada, K. Nagata, 和 T. Tamura. 1989. 刺激  $\gamma$  干扰素生产的内毒素诱导的血清因子, 感染免疫学,

57: 590~5 issn:0019~9567。

28. Novick, D., B. Cohen 和 M. Rubinstein. 1994. 人干扰素  $\alpha/\beta$  受体—鉴定和分子克隆, 细胞 77: 391~400。

29. Novick, D., B. Cohen, 和 M. Rubinstein. 1992, 在体液中存在可溶性干扰素  $\alpha$  受体分子, FEBS 通讯, 314: 445~448。

30. Novick, D., H. Engelmann, D. Wallach, 和 M. Rubinstein. 1989. 在人正常尿中存在可溶性的细胞因子受体, 实验方法杂志, 170: 1409~1414。

31. Okamura, H., H. Tsutsui, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori, K. Akita, M. Namba, F. Tanabe, K. Konishi, S. Fukuda, 和 M. Kurimoto. 1995, 通过 T 细胞诱导 IFN- $\gamma$  产生的新细胞因子的克隆, 自然 378: 88~91。

32. Rothe, H., N. A. Jenkins, N. G. Copeland 和 H. Kolb. 1997. 自身免疫糖尿病的活性时期与定位于邻近 Idd2 的新细胞因子, IGIF 的表达相关。临床研究杂志 99: 469~74 issn:0021~9738。

33. Sambrook, J., E. F. Fritsch, 和 M. T., 分子克隆: 实验室手册, 第二版, 1989, 科尔德斯普林港, 纽约, 科尔德斯普林港实验室。

34. Simonet, W. S., 等人, 骨原素: 参与骨密度调节的新分泌的蛋白质。细胞, 1997, 89(2): 309~319。

35. Sompayrac, L. H. 和 K. L. Danna, 利用猴病毒 40 的 DNA 有效地感染猴细胞, 美国科学院院刊, 1981, 78: 7575~7578。

36. Sparks, C. A., 等人, 将核有丝分裂器蛋白质 NuMA 基因分配给人染色体 11q13。基因组, 1993, 17: 222~224。

37. Tsutsui, H., K. Nakanishi, K. Matsui, K. Higashino, H. Okamura, Y. Miyazawa, 和 K. Kaneda. 1996. IFN- $\gamma$  诱导因子上调小鼠天然杀死细胞克隆的 Fas 配体介导的细胞毒性活性。免疫学杂志, 157: 3967~73 issn:0022~1767。

38. Ushio, S., M. Namba, T. Okura, K. Hattori, Y. Nukada, K. Akiyama, F. Tanabe, K. Konishi, M. Micallef, M. Fujii, K. Torigoe, T. Tanimoto, S. Fukuda, M. Ikeda, H. Okamura, 和 M. Kurimoto. 1996. 人 IFN- $\gamma$  诱导因子的 cDNA 克隆, 在大肠杆菌中的表达, 在蛋白质的生物活性上的研究。免疫学杂志, 156: 4274~4279.34, Okayama, H. 和 Berg, P. (1983) 允许在哺乳动物中表达 cDNA 插入片断的 cDNA 克隆载体。分子细胞生物学, 3: 280~289。

39. Yasuda, H., 等人, 破骨细胞生成抑制因子(OCIF)和骨原素(OPG)的特征: OPG/OCIF 抑制体外破骨细胞生成的机制, 内分泌学, 1998, 139: 1329~1337页。

## 序列表

<110> Novick, Daniela  
 Dinarello, Charles  
 Rubinstein, Menachem  
 Kim, Soo Hyun  
 Yeda 研究和开发有限公司

<120> 白细胞介素-18 结合蛋白及其制备和用途  
 Use

<130> IL-18 Rubinstein

<140>

<141>

<150> 125463

<151> 1998-07-22

<150> 122134

<151> 1997-11-06

<150> 121869

<151> 1997-09-29

<150> 121639

<151> 1997-08-27

<150> 121554

<151> 1997-08-14

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gagaagagga cgttgtcaca gataaagagc caggctcacc agctcctgac gcatgcatca 60
tgaccatgag acacaactgg acaccagacc tcagcccttt gtgggtcctg ctcctgtgtg 120
cccacgtcgt cactctcctg gtcagagcca cactgtctc gcagaccacc acagctgcca 180
ctgcctcagt tagaagcaca aaggaccctt gccctccca gccccagtg ttcccagcag 240
ctaagcagtg tccagcattg gaagtgcctt ggccagaggt ggaagtgcc ctgaatggaa 300
cgctgagctt atcctgtgtg gctgcagcc gcttcccaa cttcagcatc ctctactggc 360
tgggcaatgg ttccttcatt gagcacctcc caggccgact gtgggagggg agcaccagcc 420

```

gggaacgtgg gaggcacaggt acgcagctgt gcaaggcctt ggtgctggag cagctgaccc 480  
 ctgccctgca cagcaccaac ttctcctgtg tgctcgtgga ccctgaacag gttgtccagc 540  
 gtcacgtcgt cctggcccag ctctgggctg ggctgagggc aaccttgccc cccaccaag 600  
 aagccctgcc ctccagccac agcagtcac agcagcaggg ttaagactca gcacagggcc 660  
 agcagcagca caaccttgac cagagcttgg gtcctacctg tctacctgga gtgaacagtc 720  
 cctgactgcc tgtaggctgc gtggatgccc aacacacccc ctcttctctc gctttgggtc 780  
 ccttctctca ccaaattcaa actccattcc cacctacctc gaaaatcaca gcctccttat 840  
 aatgcctcct cctcctgcca ttctctctcc acctatccat tagccttctt aacgtcctac 900  
 tcttcacact gctctactgc tcagaaacca ccaagactgt tgatgcctta gccttgcaact 960  
 ccagggcctt acctgcattt cccacatgac tttctggaag cctcccaact attcttgctt 1020  
 ttcccagaca gctccactc ccattgtctc gtcattttag tcccgtcttc ctacacgccc 1080  
 cagcagggga acgctcaagc ctggttgaaa tgctgcctct tcagtgaagt catcctcttt 1140  
 cagctctggc cgcattctgc agacttctc tcttcgtgct gtatgttttt tttttcccc 1200  
 ttcactctaa tggactgttc caggggaagg atgggggcac cagctgcttc ggatccacac 1260  
 tgtatctgtg tcatccccac atgggtcctc ataaaggatt attcaatgga aaaaaaaaaa 1320  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1348

<210> 2

<211> 192

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> 信号

<222> (1)..(28)

<400> 2

Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu Trp Val Leu Leu  
 1 5 10 15

Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala Thr Pro Val Ser  
 20 25 30

Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser Thr Lys Asp Pro  
 35 40 45

Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys Gln Cys Pro Ala  
 50 55 60

Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr Leu  
 65 70 75 80

Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn Phe Ser Ile Leu  
 85 90 95

Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu  
 100 105 110



Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr Gly Thr Gln Leu  
115 120 125

Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala Leu His Ser Thr  
130 135 140

Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln Arg His  
145 150 155 160

Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala Thr Leu Pro Pro  
165 170 175

Thr Gln Glu Ala Leu Pro Ser Ser His Ser Ser Pro Gln Gln Gln Gly  
180 185 190

<210> 3

<211> 1038

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gagaagagga cggtgtcaca gataaagagc caggctcacc agctcctgac gcatgcatca 60  
tgaccatgag acacaactgg acaccagacc tcagcccttt gtgggtcctg ctctgtgtg 120  
cccacgtcgt cactctcctg gtcagagcca cacctgtctc gcagaccacc acagctgcc 180  
ctgcctcagt tagaagcaca aaggaccctt gccctccca gcccccagtg ttcccagcag 240  
ctaagcagtg tccagcattg gaagtgcctt ggccagaggt ggaagtgcc ctgagctggg 300  
ctgagggcaa ccttgccccc cacccaagaa gccctgccct ccagccacag cagtccacag 360  
cagcagggtt aagactcagc acagggccag cagcagcaca accttgacca gagcttgggt 420  
cctacctgtc tacctggagt gaacagtccc tgactgctg taggctgctt ggatgcgcaa 480  
cacacccctt ccttctctgc tttgggtccc ttctctcacc aaattcaaac tccattccca 540  
cctacctaga aaatcacagc ctcttataa tgctctctc tctgacctt ctctctccac 600  
ctatccatta gccttccata cgtcctactc ctacactgc tctactgctc agaaaccacc 660  
aagactgttg atgccttagc cttgcactcc agggccctac ctgcatttcc cacatgactt 720  
tctggaagcc tcccaactat tcttgccttt cccagacagc tcccaactcc atgtctctgc 780  
tcatttagtc ccgtcttctt caccgcacca gcagggaac gctcaagcct ggttgaaatg 840  
ctgcctcttc agtgaagtca tctctttcca gctctggcct cattctgcag acttccctat 900  
ttcgtgctgt atgttttttt tttcccccct cactctaatg gactgttcca gggaagggat 960  
gggggcacca gctgcttcgg atccacactg tatctgtgtc atccccacat gggctctcat 1020  
aaaggattat tcaatgga 1038

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

- 61 -

cctaataaag gggtaagatt ggactaggt a gcatcttac aaccatttgt ggtcatgaga 720  
 gctgggggtgg ggaaggattg tcaattgacc cccccagctc tgtttctaag tgctgaaaga 780  
 gctccaggct atgtacagg aggagaagcc agctactgag gaaaagccag ctactgagaa 840  
 aaagcgggag tggtttacca ttctcctccc ccacctttca ccagagaaga ggacgttgtc 900  
 acacataaag agccaggtc accagctcct gacgcatgca tcatgaccat gagacacaac 960  
 tggacaccag acctcagccc ttgtgggtc ctgctcctgt gtgcccacgt cgtcactctc 1020  
 ctggtcagag ccacacctgt ctgcagacc accacagctg ccaactgcctc agttagaagc 1080  
 acaaaggacc cctgcccctc ccagcccccag gtgttcccag cagctaagca gtgtccagca 1140  
 ttggaagtga cctggccaga ggtggaagt ccactgaatg gaacgctgag cttatcctgt 1200  
 gtggcctgca gccgcttccc caacttcagc atcctctact ggctgggcaa tggttccttc 1260  
 attgagcacc tcccaggccg actgtgggag gggagcacca gccgggaacg tgggagcaca 1320  
 ggtacgcagc tgtgcaaggc cttgtgtgtg gagcagctga cccctgccct gcacagcacc 1380  
 aacttctcct gtgtgtcctg ggaccctgaa caggttgtcc agcgtcacgt cgtcctggcc 1440  
 cagctctggg tgaggagccc aaggagaggc ctccaggaac aggaggagct ctgcttccat 1500  
 atgtggggag gaaaggggtg gctctgccag agcagcctgt gaactaatgc ccagcattcc 1560  
 tcaaggtcag ccagacaaaa aggaacttag gtcttgggca gaggagggtg agcctggggc 1620  
 aaagtgatga gatgtccctc ctttcccttg cctgatcctt gtctgccttc acttccctag 1680  
 gctgggctga gggcaacctt gccccccacc caagaagccc tgccctccag ccacagcagt 1740  
 ccacagcagc agggttaaga ctacgacag ggccagcagc agcacaacct tgaccagagc 1800  
 ttgggtccta cctgtctacc tggagtgaac agtccctgac tgccctgtagg ctgctggat 1860  
 gcgcaacaca cccctcctt ctctgcttg ggtcccttct ctaccaaact tcaaactcca 1920  
 ttcccaccta cctagaaaat cacagcctcc ttataatgcc tctcctcct gccattctct 1980  
 ctccacctat ccattagcct tctaacgtc ctactcctca cactgctcta ctgctcagaa 2040  
 accaccaaga ctgttgatgc cttagcctg cactccaggg ccctacctgc atttcccaca 2100  
 tgactttctg gaagcctccc aactattcct gcttttccca gacagctccc actcccatgt 2160  
 ctctgctcat ttagtcccgt cttcctcacc gcccagcag gggaacgctc aagcctggtt 2220  
 gaaatgctgc ctcttcagt aagtcatcct ctttcagctc tggcgcgatt ctgcagactt 2280  
 cctatcttcg tgctgtatgt ttttttttc ccccttcaact ctaatggact gttccagggg 2340  
 agggatgggg gcagcagctg cttcgatcc aactgtatc tgtgtcatcc ccacatgggt 2400  
 cctcataaag gattattcaa tggaggcatc ctgacatctg ttcatttagg cttcagttcc 2460  
 actcccagga actttgctg tcccacgagg gagtatggga gagatggact gccacacaga 2520  
 agctgaagac aacacctgtc tcaggggaac acaggcgctt gaaaaagaaa agagagaaca 2580  
 gcccataatg ctccccggga gcagaggcca ctaatggaga gtgggaagag cctggaaaga 2640  
 tgtggcctca ggaaaaggga tgagagaaag gaggtggtat ggaagactca gcaggaacaa 2700  
 ggtaggcttc aaagagccta tattcctctt ttcccacac cgatcaagtc aactcagtac 2760  
 tcacgggaga aaaatagact ttatttacia gtaataacat ttagaaaaga tccatccccg 2820  
 gcccttaaaa accttcccat cactccaaat cccaccccag tgcaagtctg gggaaggtag 2880  
 ggtgtgagct gctgctgaag gctgtcccc aacccccactc ctgagacaca gggcccatcc 2940  
 gtccctggaa agagcatcct ctggcagggt cccccaccag gtcagaccca gtccctggact 3000  
 tcaagagtga gggcccctgc tgggcccagc caccaggaca gcaggaacca gggcctactc 3060  
 ctcttatggt ccttctaga tccagaggct aagaggaga ctggccaggc ccaaggaccc 3120  
 agccatcaaa accagcctca aatctggtt tgatggagaa gtgactttgc tttaagaaaa 3180  
 aaggaggcaa ggtagggaga gcgcccacac tgtccatgct ccaggcccc tgggcccagct 3240  
 ccgagaaggc gccagtgaag gaccaggagc caggccaggg tgccggcagg catcactgtc 3300  
 tctagggtt tggctactgt tggcctggga gctgagagaa ggcaactgaga gggacagtac 3360  
 gcggaggacc aggtgacggc agcatcgggg acacagggtg ggccactcac tggtagtggc 3420  
 cctttagtgc ttgcctgaa agagacacag tcacatggcc agatgagaac ttgcgatact 3480  
 agcctgcaac cactggctgt gaagatctct tctgtctccc acgcccctgt ctggatcccc 3540

```

tcccttgtga gccccagggt tatcagttgc tggctgtgcc tgagcagctc tgggtgtctc 3600
ccatgagaat ggggccatct gtcttctctc cttggagagg agctaccagg acagggacac 3660
ctcttaccce acaccctcca gcagcctggc gtggcccatc cttggatgct acttgggtggg 3720
gcggtctggg ggggtgccat gctctcatcg ggtttccctc ccccatcctg ccagtgcctc 3780
taccttgccc ttggctcgag ggggtggcacc aatggcgcca gcagtggcgg cgctggctgt 3840
gggtgtggca atgcgcggag aacggcgggt tccactgcga gtgttggggg aagccttggg 3900
cagggccttc tttgaggctc cccgccgcag aaggctgttc cctagcttct tgggtgtgtt 3960
gaggatgctg aaggccatcg actggcgccg gtcagcctgc aaggaagggc tgtcagaccg 4020
ggagacccaa tgctgccttc ccaggccagc gtgctgtgcc acgctgtacc agcaagggtcc 4080
cgccaggggc tgcttctatc ccccttcagc cccagcctca cctgtttagt agaagctgga 4140
gctgctttct tctgggcctc agtagtgctc tgtttgcgcc cttcatgtcg gtctcgggga 4200
gtcatggggc gtgggaaaca gctggtggcc ttcttagact atggagaaga ggacagttag 4260
gcagacagta gcaagaggag tcacatctga agccagggtg cttgtcctct cagagctgag 4320
tggaacctgt aagtcaacgt gcaacctgct ccccttccca actctgggcc agatccttcc 4380
cttcccaaca gttcccatcc atgggtcagg ccttggaga gagggaaaga gagggggaag 4440
tgagggaagg agagagaagg ctccctttag tccctgtgta gctgggcctg acctgagcac 4500
agtgtggag taacaccag gagccaccgc gcctacctca ggagttccag ggccctggtg 4560
gggctctagg gagaccgtt tgcgctgctg ccgggtggtg atgccagtgc cctcggtat 4620
ctggattggc tgcatgctgg ctcgccgcag ggtctcttgg gggctctccag tttcatctc 4680
ctcatctgtg atggtgcca ggctcaggga aggctgcatg ggtggaagag gtggtcagtg 4740
gaccatagct gtatggagat ggaggaggac ctggggctgt tccagaactc tacactcgcc 4800
cgacacttat ggtcgggacc cttcctgcct acgaggtaga aagacacaag cctccttcc 4860
tgttctgctt tctacctaa ccttgggcaa atggcacaag cagtgcagtc ctgaccagat 4920
tctctctga gctctgctt acccccaggg acttcacccc tgagtgcctt ccagctgtct 4980
gttccacctg gaacatgaga aggtcacccc tccccctctt cggccagtca gtgatccagg 5040
gccctagtgc tcaggctaga tcagcagggt ggattccaag gaagggcagg gatgggaggc 5100
cctgcacagt gaccccaggc ctcaccctgg actccaggga tagcaggctt tcagatgtgg 5160
ggggcacact cgattgcgct gctgcagctc tgcaatgcgg ttccagtcat ccagctgctc 5220
aggctcatcc tggcaagtgc ccatgtagaa gctgttcctt cctgtggaag gcagggaagt 5280
gggaacaaat gagcctggag tcggcagggt acctcctggc cctggcatct tgccagcctt 5340
tgctgccacc taccocataa acttgaagcc cggcacacca gtctgattca gtgccgcagg 5400
tgcaaggata cggcacacag actatttcta tccatggggc ttgctcacca ccttctccct 5460
ggagagggca gaagaggtca cacgcagaga ctgctactac atcttattca cctgccaaagg 5520
cttgggtggc aacaccaga ggaacaaatt aaggaccggg aattaattcc caggggctcc 5580
ctgggtgcca aaggacaaga gcttccaaga agagtctggc cagcctggcc tttccagcag 5640
cccatcaccg cctgagaagg gcatggagga ctccccacag ctaagtgtca caattgtgct 5700
gggaatcccg ggcccttaac tctggctaag agtgccccc acacagccag cccctagatg 5760
ggcaggtaa gaggccctg aggtgcagg aaggaggggc aggtggagct ggatggtagc 5820
aaggaggcca gccttgatt tttaaaaagc tttcctcttt tccctgtgcc acgatccacc 5880
ttccagtcta attttggggt atagtaagtc cctgtagtc cctcacctgg agggggccca 5940
ctggacaccc cggcctggga acgacgagca gaactgcgag tgggtggggc gtagccaggc 6000
aagctgagca gggctgagtt gccataatcg ggagaaccca ggcgagctag agactgagta 6060
gaggaggtgg ctgcgaggct agcctgggaa gcaggagcag accgcgtgct gtagaacgat 6120
gagttggcgc tgtctggctc ttccacatct agcttctgga agacagagtg aatctgttgc 6180
agtgtacagt ccctggcact gtacagaagc tttccattcc cttccgaagc cctcagatcc 6240
cacggcacat ccatgtattc ccaactgctt tgcaaagggt cttaaagtgt gtgtctgcaa 6300
gaaatggggc ttgtcgacag aagccctcac aagggtggtg tgatgttgtc aagactcttc 6360
tacgcatttt tttcatggag tctattcata atgctttgag gtagggaatg cagagtgttt 6420

```

00.02.13

atcggcccat tttggagatg aagtgc aaaag aaataaaagt actagcccca aatcacactg 6480  
ctaggaagta tcagagctgg ggctaggccc catgtctcct gactagtcag gctcatccca 6540  
cagcctctgc tgtccctcag tccaaacttc cagggccctt accatgttcc agaacttccc 6600  
ccaacttctt ggtagcaggg ggcaccctaa acacacaggt ccccccctgct gtaccagggg 6660  
ccccctctcc cctcctccca aacctcccct tcaagatgtg gaaacaaagg caagggcctg 6720  
cagcctgtca ggcagtccac tgggcagcaa caatgcctct cagctgcatg gggcatgctg 6780  
ggaggcacag gatgggctgc agcttcgcca cgttctctcc cttcaccctg cacaggctca 6840  
gtgctacgca tggagagaat gctagcccta gtcaggaggc agggatctaa tcctagccct 6900  
gcctttttct tcagaagtgc ccttaaccaa gtcactgccc tttttaagac ctctcagctt 6960  
tcccactgta acatggactg gctgctcatc cctcccctgct cctgactgag tgcccagtgc 7020  
aaagatgccc ttgagaggaa gtgggaattg ctgacctgtc gac 7063

<210> 6

<211> 197

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> 信号

<222> (1)..(28)

<400> 6

Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu Trp Val Leu Leu

1

5

10

15

Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala Thr Pro Val Ser

20

25

30

Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser Thr Lys Asp Pro

35

40

45

Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys Gln Cys Pro Ala

50

55

60

Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr Leu

65

70

75

80

Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn Phe Ser Ile Leu

85

90

95

Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu

100

105

110

Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr Gly Thr Gln Leu

115

120

125

Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala Leu His Ser Thr

130

135

140

00.02.13

Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln Arg His  
145 150 155 160

Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Val Arg Ser Pro Arg Arg Gly Leu Gln  
165 170 175

Glu Gln Glu Glu Leu Cys Phe His Met Trp Gly Gly Lys Gly Gly Leu  
180 185 190

Cys Gln Ser Ser Leu  
195

<210> 7

<211> 1360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gcggccgcgt cgaccacgca gctaaacaca gctaacttga gtcttgagc tcctaaaggg 60  
aagcttctgg aaaggaaggc tcttcaggac ctcttaggag ccaaagaaga ggacgttggtc 120  
acagataaag agccaggctc accagctcct gacgcatgca tcatgaccat gagacacaac 180  
tggacaccag acctcagccc ttgtgggtc ctgtcctgt gtgcccacgt cgtaactctc 240  
ctggctcagag ccacacctgt ctgcagacc accacagctg ccaactgcctc agttagaagc 300  
acaaaggacc cctgccccctc ccagccccca gtgttcccag cagctaagca gtgtccagca 360  
ttggaagtga cctggccaga ggtggaagtg ccaactgaatg gaacgtgag cttatcctgt 420  
gtggcctgca gccgttccc caacttcagc atcctctact ggctgggcaa tggttccttc 480  
attgagcacc tcccaggccg actgtgggag gggagcacca gccgggaacg tgggagcaca 540  
ggctgggctg agggcaacct tgccccccac ccaagaagcc ctgacctcca gccacagcag 600  
tccacagcag cagggttaag actcagcaca gggccagcag cagcacaacc ttgaccagag 660  
cttgggtcct acctgtctac ctggagtga cagtccctga ctgcctgtag gctgcgtgga 720  
tgcgcaacac acccctcct tctctgctt gggtcccttc tctacccaaa ttc aaactcc 780  
attcccacct acctagaaaa tcacagcctc cttataatgc ctccctcctc tgccattctc 840  
tctccacctc tccattagcc ttcctaactg cctactcctc aactgtctct actgctcaga 900  
aaccaccaag actgttgatg ccttagcctt gcactccagg gccctacctg catttcccac 960  
atgactttct ggaagcctcc caactattct tgcttttccc agacagctcc cactcccatg 1020  
tctctgtcct tttagtccc tcttctcac cgccccagca ggggaacgct caagcctggt 1080  
tgaaatgctg cctcttcagt gaagtcaccc tctttcagct ctggccgcat tctgcagact 1140  
tcttatcttc gtgctgtatg ttttttttt ccccttcac tctaattggac tgttccaggg 1200  
aagggatggg ggcagcagct gcttcggatc cacactgtat ctgtgtcatc cccacatggg 1260  
tcctcataaa ggattattca atggaggcat cctgacatct gtccatttag gcttcagttc 1320  
cactcccagg aactttgcct gtcccacgag ggagtatggg 1360

<210> 8

<211> 161

<212> PRT

<213> Homo sapiens

00.02.13

<220>

<221> 信号

<222> (1)..(28)

<400> 8

Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu Trp Val Leu Leu  
1 5 10 15

Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala Thr Pro Val Ser  
20 25 30

Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser Thr Lys Asp Pro  
35 40 45

Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys Gln Cys Pro Ala  
50 55 60

Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr Leu  
65 70 75 80

Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn Phe Ser Ile Leu  
85 90 95

Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu  
100 105 110

Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr Gly Trp Ala Glu  
115 120 125

Gly Asn Leu Ala Pro His Pro Arg Ser Pro Ala Leu Gln Pro Gln Gln  
130 135 140

Ser Thr Ala Ala Gly Leu Arg Leu Ser Thr Gly Pro Ala Ala Ala Gln  
145 150 155 160

Pro

<210> 9

<211> 7812

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gtcgcacggta cccccgggaa agatttaata cgactcacta tagggcggga cagaattgat 60  
ctgtgagaga ctcatctagt tcatacccta ggtgaccctg ggggtggcat gggggtagat 120

tagagatccc agtctggtat cctctggaga gtaggagctc caggagctga aggtttctgg 180  
 ccaactgaact ttggctaaag cagaggtgtc acagctgctc aagattccct ggtaaaaaag 240  
 tgaaagtga atagaggggtc ggggcagtgctc tttcccagaa ggattgctcg gcatcctgcc 300  
 cttcccagaa gcagctctgg tgctgaagag agcactgcct ccctgtgtga ctgggtgagt 360  
 ccatattctc tctttgggtc tcaattttgc cttccctaata gaaggggtaa gattggacta 420  
 ggtaagcatc ttacaacccat ttgtggtcat gagagctggg gtgggggaagg attgtcactt 480  
 gaccccccca gctctgtttc taagtgtctg aagagctcca ggctatgcta cgggaggaga 540  
 agccagctac tgaggaaaag ccagctactg agaaaaagcg ggagtgggtt accatttctc 600  
 tccccaccc ttcaccagag aagaggacgt tgtcacacat aaagagccag gctcaccagc 660  
 tcctgacgca tgcattcatga ccatgagaca caactggaca ccaggtaggc cttggggcta 720  
 cgcattggca ggcggggtag ggtgaggtct atgaacagaa tggagcaatg ggctaaccgc 780  
 gagccttcac tccaaggcaa accaccagc gcacctgggtg ctgttgcttt aagaacctgg 840  
 gcagatattg tagctctggc tccagtctaa agcttctctg tactctgttc aataaagggc 900  
 taaggggtgg gtgctgaggg gtccctcttc ccgctctgat tccctggcta gaaccagac 960  
 atctctgggc tggagttaca tccctaccgc ggcagccac tctgtctcca gagccgtga 1020  
 cctgtaactg tcccttctc agacctcagc ccttctgtgg tccctgctct gtgtgccac 1080  
 gtctcactc tccgtgtcag agccacacct gtctcgaga ccaccacgc tggcactgcc 1140  
 tcagttagaa gcacaaagga cccctgcccc tcccagcccc cagtgttccc agcagctaa 1200  
 cagtgtccag cattggaagt gacctggcca gaggtggaag tggcactgag taagaagcac 1260  
 agtgggtggag ggtgggctat gggcacagag gttcccaggg tcgggttgac tccctgagcg 1320  
 cagtccccct ctgcccattg accaccagct gagccagctg ggctgagcac gcaccattct 1380  
 cccctcccaa cccagtgtca tgggtgcagg cttggcgag ctcccaagat gctccctatc 1440  
 aaataggaca gagaactcaa gacataagta atggtcacag gacctcccag agccttggtt 1500  
 gcagtggacc ccaaggccag cccctccacc cagagcctgc tggcctctgg ccatctcaga 1560  
 ggagcagcag ccatccagca ctgcctctgt caactgggtc cccaagtcac cgaggctggg 1620  
 cactagaaaa ggtcatcctg aggagacagg ttcagaagag gattcatcac gtgaaccaag 1680  
 gaccattcct cacattcccc gtgtttaggg ctagggcctc tcggagacaa ctgcattct 1740  
 gtaacggacg ttcacccta ggtggtgtgc agagcagttc tctaggttcc agatgcatgg 1800  
 ggactggggg gagctggcag agagggcaca gcagagcagg gtaggggaag ggcctgctct 1860  
 tctgaagagc taactgtctc ctgtgtccct agatggaacg ctgagcttat cctgtgtggc 1920  
 ctgcagccgc ttcaccaact tcagcactct ctactggctg ggcaatggtt ccttcattga 1980  
 gcacctccca ggccgactgt gggaggggag caccaggtga gggctgcagc agccaggtgg 2040  
 gtgggaagga agccttctgc ggccttctca tgaccttccc ttccttccg ctccagccgg 2100  
 gaacgtggga gcacaggtac gcagctgtgc aaggccttgg tgctggagca gctgacctc 2160  
 gccctgcaca gcaccaact ctctgtgtg ctctgtggac ctgaacaggt tgtccagcgt 2220  
 cagctcgtcc tggccagct ctgggtgagg agcccaagga gaggcctcca ggaacaggag 2280  
 gagctctgct tccatatgtg gggaggaaag ggtgggctct gccagagcag cctgtgaact 2340  
 aatgccagc attcctcaag gtcagccaga caaaaaggaa cttaggtctt ggcagagga 2400  
 ggtgtagcct ggggcaaagt gatgagatgt cctcctttc cttggcctga tcttgtctg 2460  
 ccttcacttc cctaggtgtg gctgagggca acctgcccc ccaccaaga agccctgcc 2520  
 tccagccaca gcagtcaca gcagcagggt taagactcag cacaggcca gcagcagcac 2580  
 aaccttgacc agagcttggg tctacctgt ctacctggag tgaacagtcc ctgactgcct 2640  
 gtaggctgcg tggatgcgca acacaccccc tcttctctg ctttgggtcc cttctctcac 2700  
 caaattcaaa ctccattccc acctacctag aaaatcacag cctccctata atgcctcctc 2760  
 ctctgccat tctctctca cctatccatt agccttcta acgtcctact cctcacactg 2820  
 ctctactgct cagaaaccac caagactgtt gatgccttag ccttgcactc caggggcccta 2880  
 cctgcatttc ccacatgact ttctggaagc ctcccaacta ttcttgcttt tcccagacag 2940  
 ctcccactcc catgtctctg ctcatattagt cccgtcttcc tcaccgcccc agcaggggaa 3000



cgctcaagcc tgggttgaat gctgcctctt cagtgaagtc atcctctttc agctctggcc 3060  
 gcattctgca gacttcctat ctctgtgctg tatgtttttt ttttccccct tcaactctaata 3120  
 ggactgttcc aggggaaggga tgggggcagc agctgcttcg gatccacact gtatctgtgt 3180  
 catccccaca tgggtcctca taaaggatta ttcaatggag gcatcctgac atctgttcat 3240  
 ttaggcttca gttccactcc caggaacttt gcctgtccca cgaggagta tgggagagat 3300  
 ggactgccac acagaagctg aagacaacac ctgcttcagg ggaacacagg cgcttgaaaa 3360  
 agaaaagaga gaacagccca taatgtctcc cgggagcaga ggccactaat ggagagtggg 3420  
 aagagcctgg aaagatgtgg cctcaggaaa agggatgaga gaaaggaggt ggtatggaag 3480  
 actcagcagg aacaaggtag gcttcaaaga gcctatatcc ctctttttcc cacaccgatc 3540  
 aagtcaactc agtactcacg ggagaaaaat agactttatt tacaagtaat aacatttaga 3600  
 aaagatccat ccccgccctt taaaaacctt cccatcactc caaatcccac cccagtgcaa 3660  
 gtctggggaa ggtagggtgt gagctgctgc tgaaggctgt cccccaaccc cactcctgag 3720  
 acacagggcc catcgcctct gggaaagagc atcctctggc aggtgctccc accaggtcag 3780  
 acccagtcct ggacttcaag agtgagggcc cctgctgggc ccagccacca ggacagcagg 3840  
 aaccagggcc tactcctctt atggtccctt ctagatccag aggctaagag gaagactggc 3900  
 caggcccaag gaccagcca tcaaaaccag cctcaaactc ggttgtgatg gagaagtgc 3960  
 tttgctttaa gaaaaaagga ggcaaggtag ggagagcgcc cacactgtcc atgctccagg 4020  
 cccctgggc cagctccgag aaggcgccag tgaaggacca gggaccaggc cagggtgcgg 4080  
 gcaggcatca ctgtctctag gggtttggt actgttggcc tgggagctga gagaaggcac 4140  
 tgagagggac agtaggcgga ggaccaggtg acggcagcat cggggacaca ggtggggcca 4200  
 ctactggtta ctggcccttt agtgctttgc ctgaaagaga cacagtcaca tggccagatg 4260  
 agaacttgcg atactagcct gcacccactg gctgggaaga tctcttctct ctcccacgcc 4320  
 cctgtctgga tccccctct tgtgagcccc agggttatca gttgctggct gtgcctgagc 4380  
 agctctgggt gctctccatg agaatggggc catctgtctt ctctccttgg agaggagcta 4440  
 ccaggacagg gacacctctt accccacacc ctccagcagc ctggcggtgg cccatcttgg 4500  
 atgctacttg gtggggcggt ctggggggtg cccatgctct catcggtttt cctcccccac 4560  
 tcctgccagt gcctctacct tgccttggc tcgaggggtg gcaccaatgg cggcagcagt 4620  
 ggcggcgctg gctgtggtgg tggcaatgcg cggagaacgg cgggttccac tgcgagtgtt 4680  
 gggggaagcc ttggacaggg ccttctttga ggctccccgc cgcagaaggc tgttccctag 4740  
 cttcttgggt gtgttgagga tgcgaaggc catcgactgg cgccggtcag cctgcaaggc 4800  
 agggctgtca gaccgggaga cccaatgctg ccttcccagg ccagcgtgct gtgccacgct 4860  
 gtaccagcaa ggtcccgcca gggcgctcgt tcatccccct tcagccccag cctcacctgt 4920  
 ttagtagaag ctggagctgc tttcttctgg gcctcagtag tgcctgttt gcgcccttca 4980  
 tgtcggtctc ggggagtcac gggcggtgg aaacagctgg tggccttctt agactatgga 5040  
 gaagaggaca gttaggcaga cagtagcaag aggagtcaca tctgaagcca ggtgtcttgt 5100  
 cctctcagag ctgagtggac cttgtaagtc aacgtgcaac ctgctcccc tcccaactct 5160  
 gggccagatc cttcccttcc caacagttcc catccatggg tcaggccctt ggagagaggg 5220  
 aaagagaggg ggaagtgagg gaaggagaga gaaggctccc tttagtctct ggtgagctgg 5280  
 gcctgacctg agcacagtgc tggagtaaca ccaggagcc accgcgccta cctcaggagt 5340  
 tccagggcc tgggtgggct ctaggagagc ccgtttgcgc tgcctgccgg tggatgatgc 5400  
 agtgccctcg gctatctgga ttggctgcat gctggctcgg cgcagggtct cttgggggtc 5460  
 tccagttttc atctcctcat ctgtgatggt gccaggtc aggggaaggct gcatgggtgg 5520  
 aagaggtggt cagtggacca tagctgtatg gagatggagg aggacctggg gctgttccag 5580  
 aactctacac tcgcccagac cttatggctg ggacccttcc tgcctacgag gtagaaagac 5640  
 acaagcctcc tttcctgttc tgccttctac ctaagccctg ggcaaattgg acaagcagtg 5700  
 cagtctgac cagattcctc tctgagctcc tgcctacccc cagggaactc acccctgagt 5760  
 gccctccagc tgtctgttcc acctggaaca tgagaaggtc accccttccc ctcttcggcc 5820  
 agtcagtgat ccagggccct agtgctcagg ctagatcagc aggtgggatt ccaagggaagg 5880

gcagggatgg gaggcctgc acagtgaccc caggcctcac cctggactcc agggatagca 5940  
 ggtcttcaga tgtggggggc acactcgatt gcgctgctgc agctctgcaa tgcggttcca 6000  
 gtcattccagc tgctcaggct catcctggca agtgcccatg tagaagctgt tccttcctgt 6060  
 ggaaggcagg gaagtgggaa caaatgagcc tggagtcggc aggtcacctc ctggccctgg 6120  
 catcttgcca gcctttgctg ccacctaccc cataaacttg aagcccggca caccagtctg 6180  
 attcagtgcc gcaggtgcag gactacggca cacagactat ttctatccta ggggcttgct 6240  
 caccaccttc tccctggaga gggcagaaga ggtcacacgc agagactgct actacatctt 6300  
 attcacctgc caaggcttgg tggccaacac ccagaggaac aaattaagga ccggaatta 6360  
 attcccagg gctccctggg gcccaaagga caagagcttc caagaagagt ctggccagcc 6420  
 tggcctttcc agcagcccat caccgctga gaaggcatg gaggactccc cacagctaag 6480  
 tgtcacaatt gtgctgggaa tcccggggcc ttaactctgg ctaagagtgc cccaacaca 6540  
 gccagccctt agatgggcag gtaagggaag ccctgaggct gcaggaagga ggggcagggtg 6600  
 gagctggatg gtagcaagga ggccagcctt ggatttttaa aaagctttcc tcttttccct 6660  
 gtgccacgat ccaccttcca gtctaatttt ggggtatagt aagtccctgt agtccctca 6720  
 cctggagggg cccacttga cccccggcc tgggaacgac gacgagaact gcgagtgggtg 6780  
 gggcggtagc caggcaagct gaggaggctt gaggtgccat aatcgggaga acccaggcga 6840  
 gctagagact gactagagga ggtggctcgc aggctagcct ggaagcagg agcagaccgc 6900  
 gtgctgtaga acgatgagtt ggcgctgtct ggctcttcca catctagctt ctggaagaca 6960  
 gagtgaatct gttgcagtgt acagtccctg gcactgtaca gaagcttccc attcccttcc 7020  
 gaagccctca gatccacgg cacatccatg tattcccaac tgctttgcaa aggtccttaa 7080  
 agtgtgtgtc tgcaagaaat gggccttgtc gacagaagcc ctccacaagg ggtgctgatg 7140  
 ttgtcaagac tcttctacgc atttttttca tggagtctat tcataatgct ttgaggtagg 7200  
 gaatgcagag tgtttatcgg cccatttttg agatgaagtg caaagaaata aagtgactag 7260  
 ccccaaatca cactgctagg aagtatcaga gctggggcta ggcccatgt ctcctgacta 7320  
 gtcaggctca tcccacagcc tctgctgtcc ctacgtccaa acttccaggg cccttaccat 7380  
 gttccagaac tcccccaac ttcttggtag cagggggcac cctaaacaca caggtccccc 7440  
 ctgctgtacc agggggcccc tctcccttc tccaaacct ccccttcaag atgtggaaac 7500  
 aaaggcaagg gcctgcagcc tctcaggcag tccactgggc agcaacaatg cctctcagct 7560  
 gcatggggca tgctgggagg cacaggatgg gctgcagctt cgccacgttc tctcccttca 7620  
 cctgcacag gctcagtgt acgcatggag agaatgctag ccttagtcag gaggcaggga 7680  
 tctaactcta gccctgcctt tttcttcaga agtgccctta accaagtcac tgcccttttt 7740  
 aagacctctc agcttttcca ctgtaacatg gactggctgc tcatccctcc ctgctcctga 7800  
 ctgagtcccc ag 7812

<210> 10

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Thr Pro Val Ser Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser

1 5 10 15

Thr Lys Asp Pro Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys

20 25 30

Gln Cys Pro Ala Leu Glu Val Thr

35 40

## 说明书附图

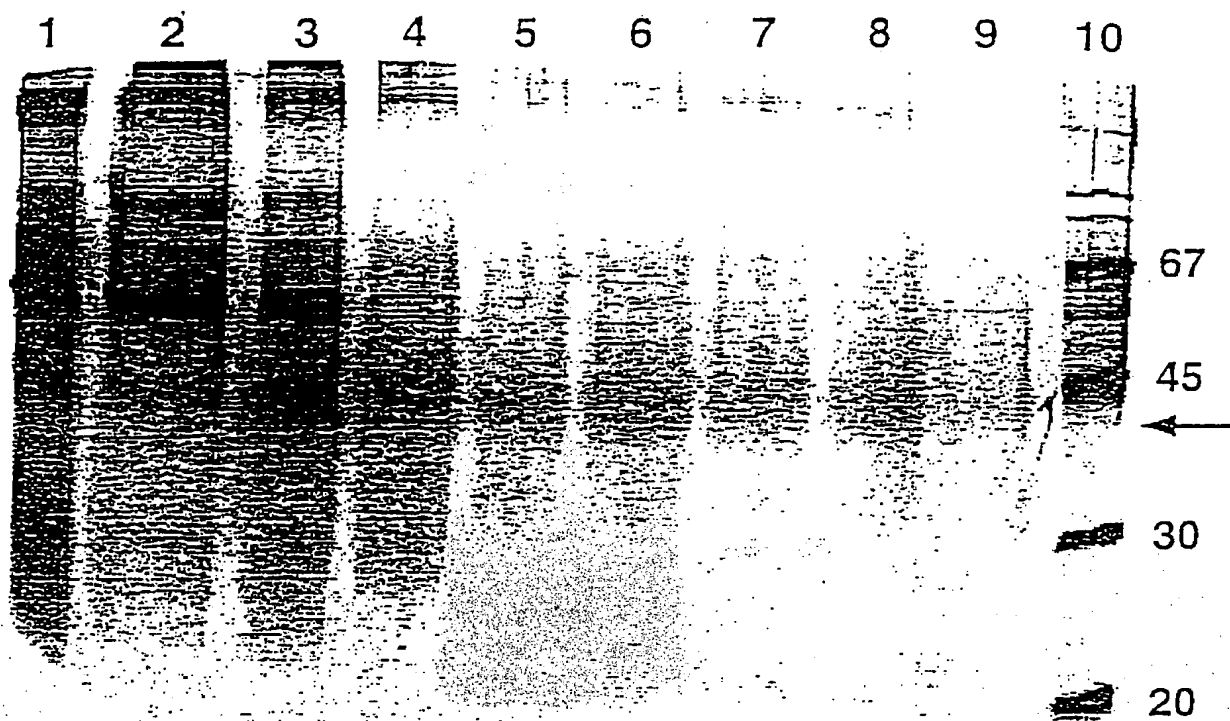


图 1

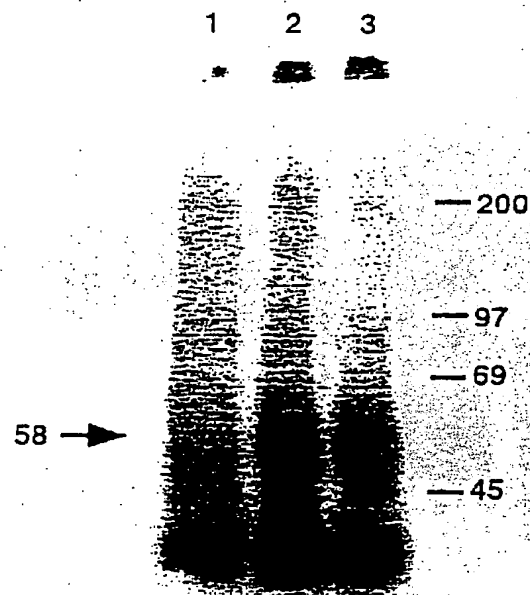


图 2

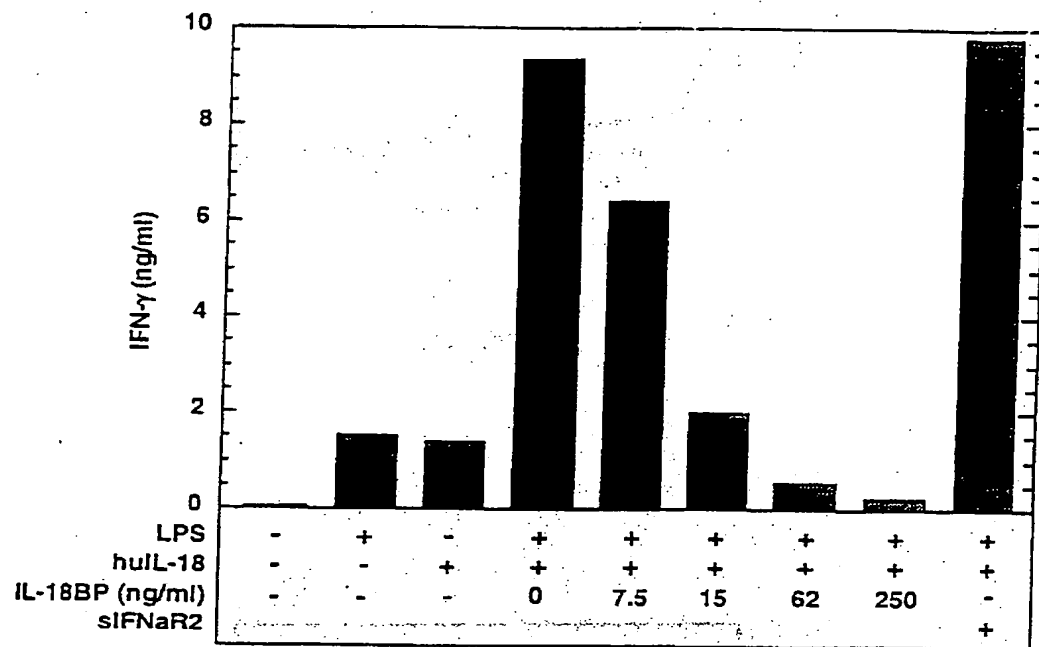


图 3A

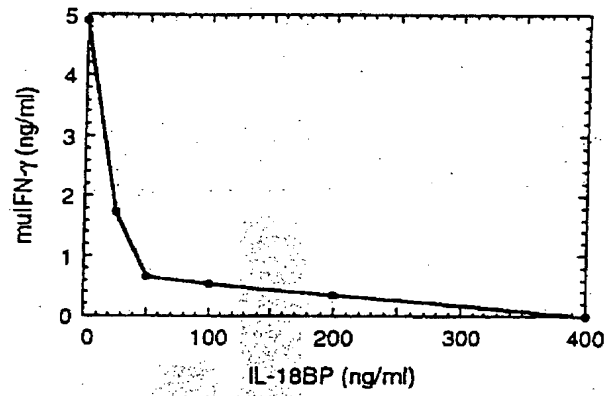


图 3B

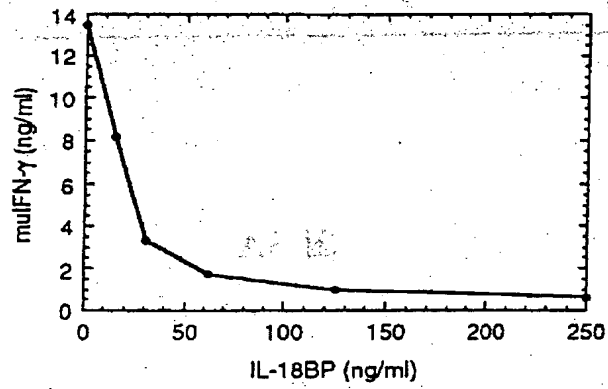


图 3C

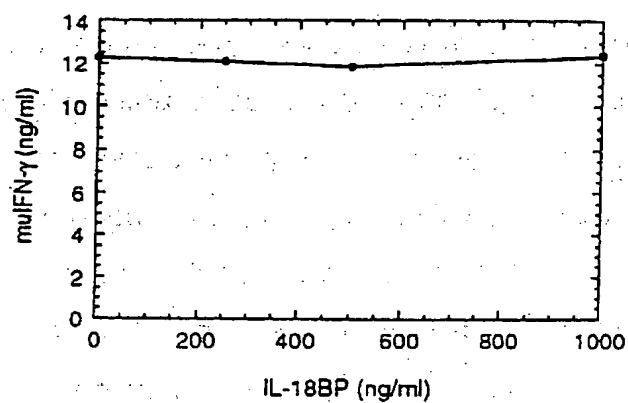


图 3D

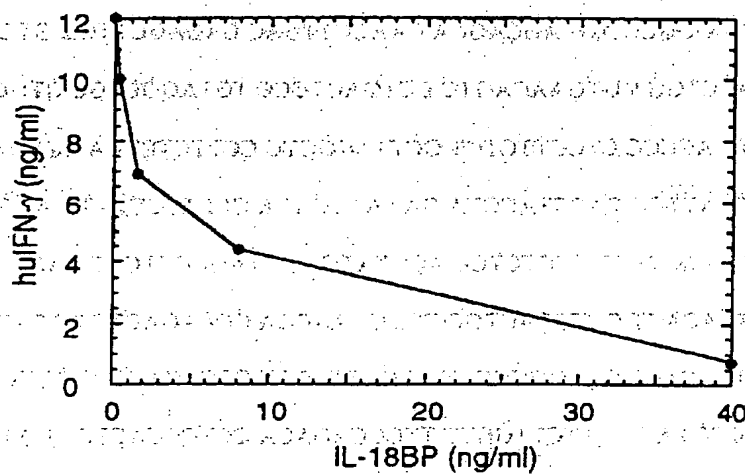


图 3E

IL-18Bpa; DNA 序列 :

长度: 1348 1997 年 12 月 14 日 15:41 类型: N Check: 2207 ..

```

1  GAGAAGAGGA CGTTGTCACA GATAAAGAGC CAGGCTCACC AGCTCCTGAC
51 GCATGCATCA TGACCATGAG ACACAACTGG ACACCAGACC TCAGCCCTTT
101 GTGGGTCCTG CTCCTGTGTG CCCACGTCGT CACTCTCCTG GTCAGAGCCA
151 CACCTGTCTC GCAGACCACC ACAGCTGCCA CTGCCTCAGT TAGAAGCACA
201 AAGGACCCCT GCCCCTCCA GCCCCCAGTG TTCCCAGCAG CTAAGCAGTG
251 TCCAGCATTG GAAGTGACCT GGCCAGAGGT GGAAGTGCCA CTGAATGGAA
301 CGCTGAGCTT ATCCTGTGTG GCCTGCAGCC GCTTCCCCAA CTCAGCATC
351 CTCTACTGGC TGGGCAATGG TTCCTTCATT GAGCACCTCC CAGGCCGACT
401 GTGGGAGGGG AGCACCAGCC GGAACGTGG GAGCACAGGT ACGCAGCTGT
451 GCAAGGCCTT GGTGCTGGAG CAGCTGACCC CTGCCCTGCA CAGCACCAAC
501 TTCTCCTGTG TGCTCGTGGA CCCTGAACAG GTTGTCCAGC GTCACGTCGT
551 CCTGGCCCAG CTCTGGGCTG GGCTGAGGGC AACCTTGCCC CCCACCCAAG
601 AAGCCCTGCC CTCCAGCCAC AGCAGTCCAC AGCAGCAGGG TTAAGACTCA
651 GCACAGGGCC AGCAGCAGCA CAACCTTGAC CAGAGCTTGG GTCCTACCTG
701 TCTACCTGGA GTGAACAGTC CCTGACTGCC TGTAGGCTGC GTGGATGCGC
751 AACACACCCC CTCCTTCTCT GCTTTGGGTC CCTTCTCTCA CCAAATTCAA
801 ACTCCATTCC CACCTACCTA GAAAATCACA GCCTCCTTAT AATGCCTCCT
851 CCTCCTGCCA TTCTCTCTCC ACCTATCCAT TAGCCTTCCT AACGTCTAC
901 TCCTCACACT GCTCTACTGC TCAGAAACCA CCAAGACTGT TGATGCCTTA
951 GCCTTGCACT CCAGGGCCCT ACCTGCATTT CCCACATGAC TTTCTGGAAG
1001 CCTCCCAACT ATTCTTGCTT TTCCCAGACA GCTCCCACTC CCATGTCTCT
1051 GCTCATTTAG TCCCGTCTTC CTCACCGCCC CAGCAGGGGA ACGCTCAAGC
1101 CTGGTTGAAA TGCTGCCTCT TCAGTGAAGT CATCCTCTTT CAGCTCTGGC
1151 CGCATTCTGC AGACTTCCTA TCTTCGTGCT GTATGTTTTT TTTTCCCCC
1201 TTCACTCTAA TGGACTGTTC CAGGGAAGGG ATGGGGGCAC CAGCTGCTTC

```

图 4



1251 GGATCCACAC TGTATCTGTG TCATCCCCAC ATGGGTCCTC ATAAAGGATT

1301 ATTCAATGGA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

(SEQ ID NO:1)

IL-18Bpa; 蛋白质序列 :

长度: 192 1998 年 06 月 05 日 13:39 类型: P Check: 3073 ..

1 MRHNWTPDLS PLWVLLCAH VVTLLVRATP VSQTTTAATA SVRSTKDPCP

51 SQPPVFPAAK QCPALEVTWP EVEVPLNGTL SLSCVACSRF PNFSILYWLG

101 NGSFIEHLPG RLWEGSTSRE RGSTGTQLCK ALVLEQLTPA LHSTNFCVL

151 VDPEQVVQRH VVLAQLWAGL RATLPPTQEA LPSSHSPQQ QG

ITHTTA... (SEQ ID NO:2)

TAETDTHPLA QDTTADDTED DWATTHQQA QITDTTAA QI QDADDAWDA

TAETDTHPLA QDTTADDTED DWATTHQQA QITDTTAA QI QDADDAWDA

TAETDTHPLA QDTTADDTED DWATTHQQA QITDTTAA QI QDADDAWDA

TAETDTHPLA QDTTADDTED DWATTHQQA QITDTTAA QI QDADDAWDA

TAETDTHPLA QDTTADDTED DWATTHQQA QITDTTAA QI QDADDAWDA

TAETDTHPLA QDTTADDTED DWATTHQQA QITDTTAA QI QDADDAWDA

TAETDTHPLA QDTTADDTED DWATTHQQA QITDTTAA QI QDADDAWDA

TAETDTHPLA QDTTADDTED DWATTHQQA QITDTTAA QI QDADDAWDA

TAETDTHPLA QDTTADDTED DWATTHQQA QITDTTAA QI QDADDAWDA

TAETDTHPLA QDTTADDTED DWATTHQQA QITDTTAA QI QDADDAWDA

TAETDTHPLA QDTTADDTED DWATTHQQA QITDTTAA QI QDADDAWDA

TAETDTHPLA QDTTADDTED DWATTHQQA QITDTTAA QI QDADDAWDA

TAETDTHPLA QDTTADDTED DWATTHQQA QITDTTAA QI QDADDAWDA

TAETDTHPLA QDTTADDTED DWATTHQQA QITDTTAA QI QDADDAWDA

TAETDTHPLA QDTTADDTED DWATTHQQA QITDTTAA QI QDADDAWDA

TAETDTHPLA QDTTADDTED DWATTHQQA QITDTTAA QI QDADDAWDA

TAETDTHPLA QDTTADDTED DWATTHQQA QITDTTAA QI QDADDAWDA

图4A

IL-18BPb; DNA 序列

长度: 1038 1998 年 06 月 19 日 14:10 类型: N Check: 8005 ..

1 GAGAAGAGGA CGTTGTCACA GATAAAGAGC CAGGCTCACC AGCTCCTGAC  
51 GCATGCATCA TGACCATGAG ACACA<sup>ACT</sup>GG ACACCAGACC TCAGCCCTTT  
101 GTGGGTCCTG CTCCTGTGTG CCCACGTCGT CACTCTCCTG GTCAGAGCCA  
151 CACCTGTCTC GCAGACCACC ACAGCTGCCA CTGCCTCAGT TAGAAGCACA  
201 AAGGACCCCT GCCCCTCCCA GCCCCCAGTG TTCCCAGCAG CTAAGCAGTG  
251 TCCAGCATTG GAAGTGACCT GGCCAGAGGT GGAAGTGCCA CTGAGCTGGG  
301 CTGAGGGCAA CCTTGCCCCC CACCCAAGAA GCCCTGCCCT CCAGCCACAG  
351 CAGTCCACAG CAGCAGGGTT AAGACTCAGC ACAGGGCCAG CAGCAGCACA  
401 ACCTTGACCA GAGCTTGGGT CCTACCTGTC TACCTGGAGT GAACAGTCCC  
451 TGA<sup>CT</sup>GCCTG TAGGCTGCGT GGATGCGCAA CACACCCCT CCTTCTCTGC  
501 TTTGGGTCCC TTCTCTCACC AAATTCAAAC TCCATTCCCA CCTACCTAGA  
551 AAATCACAGC CTCCTTATAA TGCCTCCTCC TCCTGCCATT CTCTCTCCAC  
601 CTATCCATTA GCCTTCCTAA CGTCCTACTC CTCACACTGC TCTACTGCTC  
651 AGAAACCACC AAGACTGTTG ATGCCTTAGC CTTGCACTCC AGGGCCCTAC  
701 CTGCATTTC CACATGACTT TCTGGAAGCC TCCCAACTAT TCTTGCTTTT  
751 CCCAGACAGC TCCCACTCCC ATGTCTCTGC TCATTTAGTC CCGTCTTCCT  
801 CACCGCCCCA GCAGGGGAAC GCTCAAGCCT GGTGAAATG CTGCCTCTTC  
851 AGTGAAGTCA TCCTCTTTCA GCTCTGGCCG CATTCTGCAG ACTTCCTATC  
901 TTCGTGCTGT ATGTTTTTTT TTTCCCCCTT CACTCTAATG GACTGTTCCA  
951 GGAAGGGAT GGGGGCACCA GCTGCTTCGG ATCCACACTG TATCTGTGTC  
1001 ATCCCCACAT GGGTCCTCAT AAAGGATTAT TCAATGGA

(SEQ ID NO:3)

图 5

huIL-18BPb  
克隆-m7  
肽

1 MRHNWTPD LSPLWVLLLC AHVVTLLVRA TPVSQTTTAA TASVRSTKDP  
49 CPSQPPVFPA AKQCPALEVT WPEVEVPLSW AEGNLAPHPR SPALQPQOST  
99 AAGLRLSTGP AAAQP\*

(SEQ ID NO:4)

图 5A

hulL18BPc.seq 长度: 7063 1998 年 07 月 16 日 19:47 类型: N Check: 9314 ..

```

1 GAATTCGCGG CCGCGTCGAC GCCAGAGGGG CTAGGATGAG AGACAGAGGG
51 TGTGATGGTG GGTGCTGGGA AATGTACCCG ACCTTGGGGC TGGTGGCTGG
101 GGGAGTGGGT AGCCTGGGAA AGGCCAGGAT GTGGACGGAC TGGTATGGCA
151 TTGAGCCTGA AGTGGTCCAA CTTGGGGTTC CCCAGTGCCT AGGAAAGTTG
201 TCCCCTTGAA TGTCAGTGTG AAGGTGAAGG AGGAAGCAGA TGCTGTTC
251 TATGGAAACA AAGACCTGGC TGTGAAGAGG GGAGGCGGAC ACCAAAGTCC
301 TGACACTTGG GCGGGACAGA ATTGATCTGT GAGAGACTCA TCTAGTTCAT
351 ACCCTAGGTG ACCCTGGGGG TGGCATGGGG GTAGATTAGA GATCCCAGTC
401 TGGTATCCTC TGGAGAGTAG GAGTCCCAGG AGCTGAAGGT TTCTGGCCAC
451 TGAAC TTTGG CTAAAGCAGA GGTGTCACAG CTGCTCAAGA TTCCCTGGTT
501 AAAAAGTGAA AGTGAAATAG AGGGTCGGGG CAGTGCTTTC CCAGAAGGAT
551 TGCTCGGCAT CCTGCCCTTC CCAGAAGCAG CTCTGGTGCT GAAGAGAGCA
601 CTGCCTCCCT GTGTGACTGG GTGAGTCCAT ATTCTCTCTT TGGGTCTCAA
651 TTTTGCCTTC CCTAATGAAG GGGTAAGATT GGACTAGGTA AGCATCTTAC
701 AACCA TTTGT GGTCATGAGA GCTGGGGTGG GGAAGGATTG TCACTTGACC
751 CCCCCAGCTC TGTTTCTAAG TGCTGAAAGA GCTCCAGGCT ATGCTACGGG
801 AGGAGAAGCC AGCTACTGAG GAAAAGCCAG CTA CTGAGAA AAAGCGGGAG
851 TGGTTTACCA TTCTCCTCCC CCACCTTTCA CCAGAGAAGA GGACGTTGTC
901 ACACATAAAG AGCCAGGCTC ACCAGCTCCT GACGCATGCA TCATGACCAT
951 GAGACACAAC TGGACACCAG ACCTCAGCCC TTTGTGGGTC CTGCTCCTGT
1001 GTGCCCACGT CGTCACTCTC CTGGTCAGAG CCACACCTGT CTCGCAGACC
1051 ACCACAGCTG CCACTGCCTC AGTTAGAAGC ACAAAGGACC CCTGCCCTC
1101 CCAGCCCCCA GTGTTCCCAG CAGCTAAGCA GTGTCCAGCA TTGGAAGTGA
1151 CCTGGCCAGA GGTGGAAGTG CCACTGAATG GAACGCTGAG CTTATCCTGT
1201 GTGGCCTGCA GCCGCTTCCC CAACTTCAGC ATCCTCTACT GGCTGGGCAA

```

图 6

1251 TGGTTCCTTC ATTGAGCACC TCCCAGGCCG ACTGTGGGAG GGGAGCACCA  
 1301 GCCGGGAACG TGGGAGCACA GGTACGCAGC TGTGCAAGGC CTTGGTGCTG  
 1351 GAGCAGCTGA CCCCTGCCCT GCACAGCACC AACTTCTCCT GTGTGCTCGT  
 1401 GGACCCTGAA CAGGTTGTCC AGCGTCACGT CGTCCTGGCC CAGCTCTGGG  
 1451 TGAGGAGCCC AAGGAGAGGC CTCCAGGAAC AGGAGGAGCT CTGCTTCCAT  
 1501 ATGTGGGGAG GAAAGGGTGG GCTCTGCCAG AGCAGCCTGT GAACTAATGC  
 1551 CCAGCATTCC TCAAGGTCAG CCAGACAAAA AGGAACTTAG GTCTTGGGCA  
 1601 GAGGAGGTGT AGCCTGGGGC AAAGTGATGA GATGTCCCTC CTTTCCTTGG  
 1651 CCTGATCCTT GTCTGCCTTC ACTTCCCTAG GCTGGGCTGA GGGCAACCTT  
 1701 GCCCCCACC CAAGAAGCCC TGCCCTCCAG CCACAGCAGT CCACAGCAGC  
 1751 AGGGTTAAGA CTCAGCACAG GGCCAGCAGC AGCACAACCT TGACCAGAGC  
 1801 TTGGGTCCTA CCTGTCTACC TGGAGTGAAC AGTCCCTGAC TGCCTGTAGG  
 1851 CTGCGTGGAT GCGCAACACA CCCCTCCTT CTCTGCTTTG GGTCCCTTCT  
 1901 CTCACCAAAT TCAAACCTCA TTCCACCTA CCTAGAAAAT CACAGCCTCC  
 1951 TTATAATGCC TCCTCCTCCT GCCATTCTCT CTCCACCTAT CCATTAGCCT  
 2001 TCCTAACGTC CTAATCCTCA CACTGCTCTA CTGCTCAGAA ACCACCAAGA  
 2051 CTGTTGATGC CTTAGCCTTG CACTCCAGGG CCCTACCTGC ATTTCCCACA  
 2101 TGACTTTCTG GAAGCCTCCC AACTATTCTT GCTTTTCCCA GACAGCTCCC  
 2151 ACTCCCATGT CTCTGCTCAT TTAGTCCCGT CTTCTCACC GCCCCAGCAG  
 2201 GGGAACGCTC AAGCCTGGTT GAAATGCTGC CTCTTCAGTG AAGTCATCCT  
 2251 CTTTCAGCTC TGGCCGCATT CTGCAGACTT CCTATCTTCG TGCTGTATGT  
 2301 TTTTTTTTTT CCCCTTCACT CTAATGGACT GTTCCAGGGA AGGGATGGGG  
 2351 GCAGCAGCTG CTTCCGATCC AACTGTATC TGTGTCATCC CCACATGGGT  
 2401 CCTCATAAAG GATTATTCAA TGGAGGCATC CTGACATCTG TTCATTTAGG  
 2451 CTTTCAGTTC ACTCCAGGA ACTTTGCCTG TCCCACGAGG GAGTATGGGA  
 2501 GAGATGGACT GCCACACAGA AGCTGAAGAC AACACCTGCT TCAGGGGAAC

图 6A

2551 ACAGGCGCTT GAAAAAGAAA AGAGAGAACA GCCCATAATG CTCCCCGGA  
 2601 GCAGAGGCCA CTAATGGAGA GTGGGAAGAG CCTGGAAAGA TGTGGCCTCA  
 2651 GGAAAAGGGA TGAGAGAAAG GAGGTGGTAT GGAAGACTCA GCAGGAACAA  
 2701 GGTAGGCTTC AAAGAGCCTA TATTCCTCTT TTTCCACAC CGATCAAGTC  
 2751 AACTCAGTAC TCACGGGAGA AAAATAGACT TTATTTACAA GTAATAACAT  
 2801 TTAGAAAAGA TCCATCCCCG GCCCTTAAAA ACCTTCCCAT CACTCCAAAT  
 2851 CCCACCCAG TGCAAGTCTG GGGAAGGTAG GGTGTGAGCT GCTGCTGAAG  
 2901 GCTGTCCCC AACCCCACTC CTGAGACACA GGGCCCATCC GTCCTGGGAA  
 2951 AGAGCATCCT CTGGCAGGTG CTCCCACCAG GTCAGACCCA GTCCTGGACT  
 3001 TCAAGAGTGA GGGCCCCTGC TGGGCCCAGC CACCAGGACA GCAGGAACCA  
 3051 GGGCCTACTC CTCTTATGGT CCCTTCTAGA TCCAGAGGCT AAGAGGAAGA  
 3101 CTGGCCAGGC CCAAGGACCC AGCCATCAAA ACCAGCCTCA AATCTGGTTG  
 3151 TGATGGAGAA GTGACTTTGC TTAAAGAAAA AAGGAGGCAA GGTAGGGAGA  
 3201 GCGCCACAC TGTCCATGCT CCAGGCCCCC TGGGCCAGCT CCGAGAAGGC  
 3251 GCCAGTGAAG GACCAGGGAC CAGGCCAGGG TCGGGCAGG CATCACTGTC  
 3301 TCTAGGGGTT TGGCTACTGT TGGCCTGGGA GCTGAGAGAA GGCCTGAGA  
 3351 GGGACAGTAG GCGGAGGACC AGGTGACGGC AGCATCGGGG ACACAGGTGG  
 3401 GGCCACTCAC TGGTACTGGC CCTTTAGTGC TTTGCCTGAA AGAGACACAG  
 3451 TCACATGGCC AGATGAGAAC TTGCGATACT AGCCTGCACC CACTGGCTGG  
 3501 GAAGATCTCT TCCTGCTCCC ACGCCCCTGT CTGGATCCCC TCCCTTGTA  
 3551 GCCCCAGGGT TATCAGTTGC TGGCTGTGCC TGAGCAGCTC TGGGTGCTCT  
 3601 CCATGAGAAT GGGGCCATCT GTCTTCTCTC CTTGGAGAGG AGCTACCAGG  
 3651 ACAGGGACAC CTCTTACCCC ACACCCTCCA GCAGCCTGGC GTGGCCCCAT  
 3701 CTTGGATGCT ACTTGGTGGG GCGGTCTGGG GGGTGCCAT GCTCTCATCG  
 3751 GGTTCCTC CCCCATCCTG CCAGTGCCTC TACCTTGCCC TTGGCTCGAG  
 3801 GGGTGGCACC AATGGCGGCA GCAGTGGCGG CGCTGGCTGT GGTGGTGGCA

图 6B

3851 ATGCGCGGAG AACGGCGGGT TCCACTGCCA GTGTTGGGGG AAGCCTTGGA  
3901 CAGGGCCTTC TTTGAGGCTC CCCGCCGAG AAGGCTGTTC CCTAGCTTCT  
3951 TGGGTGTGTT GAGGATGCTG AAGGCCATCG ACTGGCGCCG GTCAGCCTGC  
4001 AAGGAAGGGC TGTCAGACCG GGAGACCCAA TGCTGCCTTC CCAGGCCAGC  
4051 GTGCTGTGCC ACGCTGTACC AGCAAGGTCC CGCCAGGGCG TCGCTTCATC  
4101 CCCCTTCAGC CCCAGCCTCA CCTGTTTAGT AGAAGCTGGA GCTGCTTTCT  
4151 TCTGGGCCTC AGTAGTGCTC TGTTTGCGCC CTTCATGTCTG GTCTCGGGGA  
4201 GTCATGGGGC GTGGGAAACA GCTGGTGGCC TTCTTAGACT ATGGAGAAGA  
4251 GGACAGTTAG GCAGACAGTA GCAAGAGGAG TCACATCTGA AGCCAGGTGT  
4301 CTTGTCCTCT CAGAGCTGAG TGGACCTTGT AAGTCAACGT GCAACCTGCT  
4351 CCCCTTCCCA ACTCTGGGCC AGATCCTTCC CTTCCCAACA GTTCCCATCC  
4401 ATGGGTCAGG CCCTTGGAGA GAGGGAAAGA GAGGGGAAG TGAGGGAAGG  
4451 AGAGAGAAGG CTCCCTTTAG TCCTTGGTGA GCTGGGCCTG ACCTGAGCAC  
4501 AGTGCTGGAG TAACACCCAG GAGCCACCGC GCCTACCTCA GGAGTTCCAG  
4551 GGCCCTGGTG GGGCTCTAGG GAGACCCGTT TCGCTGCTG CCGGGTGGTG  
4601 ATGCCAGTGC CCTCGGCTAT CTGGATTGGC TGCATGCTGG CTCGGCGCAG  
4651 GGTCTCTTGG GGGTCTCCAG TTTTCATCTC CTCATCTGTG ATGGTGCCCA  
4701 GGCTCAGGGA AGGCTGCATG GGTGGAAGAG GTGGTCAGTG GACCATAGCT  
4751 GTATGGAGAT GGAGGAGGAC CTGGGGCTGT TCCAGAACTC TACACTCGCC  
4801 CGACACTTAT GGTGCGGACC CTTCTGCCT ACGAGGTAGA AAGACACAAG  
4851 CCTCCTTTCC TGTTCTGCTT TCTACCTAAG CCCTGGGCAA ATGGCACAAG  
4901 CAGTGCAGTC CTGACCAGAT TCCTCTCTGA GCTCCTGCCT ACCCCCAGGG  
4951 ACTTCACCCC TGAGTGCCCT CCAGCTGTCT GTTCCACCTG GAACATGAGA  
5001 AGGTCACCCC TTCCCCTCTT CGGCCAGTCA GTGATCCAGG GCCCTAGTGC  
5051 TCAGGCTAGA TCAGCAGGTG GGATTCCAAG GAAGGGCAGG GATGGGAGGC  
5101 CCTGCACAGT GACCCCAGGC CTCACCCTGG ACTCCAGGGA TAGCAGGTCT

图 6C

5151 TCAGATGTGG GGGGCACACT CGATTGCGCT GCTGCAGCTC TGCAATGCGG  
 5201 TTCCAGTCAT CCAGCTGCTC AGGCTCATCC TGGCAAGTGC CCATGTAGAA  
 5251 GCTGTTCCCTT CCTGTGGAAG GCAGGGAAGT GGAACAAAT GAGCCTGGAG  
 5301 TCGGCAGGTC ACCTCCTGGC CCTGGCATCT TGCCAGCCTT TGCTGCCACC  
 5351 TACCCCATAA ACTTGAAGCC CGGCACACCA GTCTGATTCA GTGCCGCAGG  
 5401 TGCAGGAGTA CGGCACACAG ACTATTTCTA TCCTAGGGGC TTGCTCACCA  
 5451 CTTTCTCCCT GGAGAGGGCA GAAGAGGTCA CACGCAGAGA CTGCTACTAC  
 5501 ATCTTATTCA CCTGCCAAGG CTTGGTGGCC AACACCCAGA GGAACAAATT  
 5551 AAGGACCGGG AATTAATTCC CAGGGGCTCC CTGGTGCCCA AAGGACAAGA  
 5601 GCTTCCAAGA AGAGTCTGGC CAGCCTGGCC TTTCCAGCAG CCCATCACCG  
 5651 CCTGAGAAGG GCATGGAGGA CTCCCCACAG CTAAGTGTC CAATTGTGCT  
 5701 GGAATCCCG GGCCCTTAAC TCTGGCTAAG AGTGCCCCCA ACACAGCCAG  
 5751 CCCCTAGATG GGCAGGTAAG GAAGGCCCTG AGGCTGCAGG AAGGAGGGGC  
 5801 AGGTGGAGCT GGATGGTAGC AAGGAGGCCA GCCTTGGATT TTAAAAAGC  
 5851 TTTCTCTTT TCCCTGTGCC ACGATCCACC TTCCAGTCTA ATTTTGGGGT  
 5901 ATAGTAAGTC CCTGTAGTCC CCTCACCTGG AGGGGCCCCA CTGGACACCC  
 5951 CGGCCTGGGA ACGACGAGCA GAACTGCGAG TGGTGGGGCG GTAGCCAGGC  
 6001 AAGCTGAGCA GGGCTGAGTT GCCATAATCG GGAGAACCCA GGCGAGCTAG  
 6051 AGACTGAGTA GAGGAGGTGG CTCGCAGGCT AGCCTGGGAA GCAGGAGCAG  
 6101 ACCGCGTGCT GTAGAACGAT GAGTTGGCGC TGTCTGGCTC TTCCACATCT  
 6151 AGCTTCTGGA AGACAGAGTG AATCTGTTGC AGTGTACAGT CCCTGGCACT  
 6201 GTACAGAAGC TTCCATTCC CTTCCGAAGC CCTCAGATCC CACGGCACAT  
 6251 CCATGTATTC CCAACTGCTT TGCAAAGGTC CTAAAGTGT GTGTCTGCAA  
 6301 GAAATGGGCC TTGTCGACAG AAGCCCTCAC AAGGTGGTGC TGATGTTGTC  
 6351 AAGACTCTTC TACGCATTTT TTTCATGGAG TCTATTCATA ATGCTTTGAG  
 6401 GTAGGGAATG CAGAGTGTTT ATCGGCCCAT TTTGGAGATG AAGTGCAAAG

图 6D



00.02.13

6451 AAATAAAGTG ACTAGCCCCA AATCACACTG CTAGGAAGTA TCAGAGCTGG  
6501 GGCTAGGCCC CATGTCTCCT GACTAGTCAG GCTCATCCCA CAGCCTCTGC  
6551 TGTCCCTCAG TCCAAACTTC CAGGGCCCTT ACCATGTTCC AGAACTTCCC  
6601 CCAACTTCTT GGTAGCAGGG GGCACCCTAA ACACACAGGT CCCCCTGCT  
6651 GTACCAGGGG CCCCCTCTCC CCTCCTCCCA AACCTCCCCT TCAAGATGTG  
6701 GAAACAAAGG CAAGGGCCTG CAGCCTGTCA GGCAGTCCAC TGGGCAGCAA  
6751 CAATGCCTCT CAGCTGCATG GGGCATGCTG GGAGGCACAG GATGGGCTGC  
6801 AGCTTCGCCA CGTTCTCTCC CTTACCCTG CACAGGCTCA GTGCTACGCA  
6851 TGGAGAGAAT GCTAGCCTTA GTCAGGAGGC AGGGATCTAA TCCTAGCCCT  
6901 GCCTTTTTCT TCAGAAGTGC CCTTAACCAA GTCAGTCCCC TTTTAAAGAC  
6951 CTCTCAGCTT TCCCACTGTA ACATGGACTG GCTGCTCATC CCTCCCTGCT  
7001 CCTGACTGAG TGCCCAGTGC AAAGATGCCC TTGAGAGGAA GTGGGAATTG  
7051 CTGACCTGTC GAC

(SEQ ID NO:5)

IL-18BPc; 蛋白质

长度: 197 1998 年 06 月 05 日 13:41 类型: P Check: 3353 ..

1 MRHNWTPDLS PLWVLLCAH VVTLVLRATP VSQTTAATA SVRSTKDPCP  
51 SQPPVFPAAK QCPALEVTWP EVEVPLNGTL SLSCVACSRF PNFSILYWLG  
101 NGSFIEHLPGLWEGSTSRE RGSTGTQLCK ALVLEQLTPA LHSTNFSCVL  
151 VDPEQVVQRH VVLAQLWVRS PRRGLQEQUEE LCFHMGWGKG GLCQSSL

(SEQ ID NO:6)

图 6E

000213

IL-18BPd: DNA

长度: 1360 1998 年 06 月 19 日 14:55 类型: N Check: 8757 ..

1 GCGGCCGCGT CGACCACGCA GCTAAACACA GCTAACTTGA GTCTTGGAGC  
51 TCCTAAAGGG AAGCTTCTGG AAAGGAAGGC TCTTCAGGAC CTCTTAGGAG  
101 CCAAAGAAGA GGACGTTGTC ACAGATAAAG AGCCAGGCTC ACCAGCTCCT  
151 GACGCATGCA TCATGACCAT GAGACACAAC TGGACACCAG ACCTCAGCCC  
201 TTTGTGGGTC CTGCTCCTGT GTGCCACGT CGTCACTCTC CTGGTCAGAG  
251 CCACACCTGT CTCGCAGACC ACCACAGCTG CCACTGCCTC AGTTAGAAGC  
301 ACAAAGGACC CCTGCCCCTC CCAGCCCCCA GTGTTCCAG CAGCTAAGCA  
351 GTGTCCAGCA TTGGAAGTGA CCTGGCCAGA GGTGGAAGTG CCACTGAATG  
401 GAACGCTGAG CTTATCCTGT GTGGCCTGCA GCCGCTTCCC CAACTTCAGC  
451 ATCCTCTACT GGCTGGGCAA TGGTTCCTTC ATTGAGCACC TCCCAGGCCG  
501 ACTGTGGGAG GGGAGCACCA GCCGGAACG TGGGAGCACA GGCTGGGCTG  
551 AGGGCAACCT TGCCCCCACC CCAAGAAGCC CTGCCCTCCA GCCACAGCAG  
601 TCCACAGCAG CAGGGTTAAG ACTCAGCACA GGGCCAGCAG CAGCACAACC  
651 TTGACCAGAG CTGGGTCCT ACCTGTCTAC CTGGAGTGAA CAGTCCCTGA  
701 CTGCCTGTAG GCTGCGTGGA TGEGCAACAC ACCCCCTCCT TCTCTGCTTT  
751 GGGTCCCTTC TCTACCAAA TTCAAACTCC ATTCCACCT ACCTAGAAAA  
801 TCACAGCCTC CTTATaATGC CTCCTCCTCC TGCCATTCTC TCTCCACCTA  
851 TCCATTAGCC TTCCTAACGT CCTACTCCTC ACACTGCTCT ACTGCTCAGA  
901 AACCACCAAG ACTGTTGATG CCTTAGCCTT GCACTCCAGG GCCCTACCTG  
951 CATTTCCAC ATGACITTTCT GGAAGCCTCC CAACTATTCT TGCTTTTCCC  
1001 AGACAGCTCC CACTCCCATG TCTCTGCTCA TTTAGTCCCG TCTTCCTCAC  
1051 CGCCCCAGCA GGGGAACGCT CAAGCCTGGT TGAAATGCTG CCTCTTCAGT  
1101 GAAGTCATCC TCTTTCAGCT CTGGCCGCAT TCTGCAGACT TCCTATCTTC  
1151 GTGCTGTATG TTTTTTTTTT CCCCCTTCAC TCTAATGGAC TGTTCCAGGG

图 7

000213

1201 AAGGGATGGG GGCAGCAGCT GCTTCGGATC CACACTGTAT CTGTGTCATC  
1251 CCCACATGGG TCCTCATAAA GGATTATTCA ATGGAGGCAT CCTGACATCT  
1301 GTCCATTTAG GCTTCAGTTC CACTCCCAGG AACTTTGCCT GTCCCACGAG  
1351 GGAGTATGGG

(SEQ ID NO:7)

IL-18BPd; 蛋白质

长度: 161 1998 年 06 月 05 日 13:40 类型: P Check: 2239 ..

1 MRHNWTPDLS PLWVLLCAH VVTLLVRATP VSQTTTAATA SVRSTKDPCP

51 SQPPVFPAAK QCPALEVTWP EVEVPLNGTL SLSCVACSRF PNFSILYWLG

101 NGSFIEHLPG RLWEGSTSRE RGSTGWAEGN LAPHPRSPAL QPQQSTAAGL

151 RLSTGPAAAQ P

(SEQ ID NO:8)

图 7A

00:00:13

HuIL-18BP 基因

长度: 7812 1998 年 07 月 15 日 11:55 类型: N Check: 7058 ..

1 GTCGACGGTA CCCCCGGGAA AGATTTAATA CGACTCACTA TAGGGCGGGA  
51 CAGAATTGAT CTGTGAGAGA CTCATCTAGT TCATACCCTA GGTGACCCTG  
101 GGGGTGGCAT GGGGGTAGAT TAGAGATCCC AGTCTGGTAT CCTCTGGAGA  
151 GTAGGAGTCC CAGGAGCTGA AGGTTTCTGG CCACTGAACT TTGGCTAAAG  
201 CAGAGGTGTC ACAGCTGCTC AAGATTCCCT GGTTAAAAAG TGAAAGTGAA  
251 ATAGAGGGTC GGGGCAGTGC TTTCCCAGAA GGATTGCTCG GCATCCTGCC  
301 CTTCCCAGAA GCAGCTCTGG TGCTGAAGAG AGCACTGCCT CCCTGTGTGA  
351 CTGGGTGAGT CCATATTCTC TCTTTGGGTC TCAATTTTGC CTTCCCTAAT  
401 GAAGGGGTAA GATTGGACTA GGTAAGCATC TTACAACCAT TTGTGGTCAT  
451 GAGAGCTGGG GTGGGGAAGG ATTGTCACTT GACCCCCCA GCTCTGTTTC  
501 TAAGTGCTGA AAGAGCTCCA GGCTATGCTA CGGGAGGAGA AGCCAGCTAC  
551 TGAGGAAAAG CCAGCTACTG AGAAAAAGCG GGAGTGTTTT ACCATTCTCC  
601 TCCCCACCT TTCACCAGAG AAGAGGACGT TGTCACACAT AAAGAGCCAG  
651 GCTCACCAGC TCCTGACGCA TGCATCATGA CCATGAGACA CAACTGGACA  
701 CCAGGTAGGC CTTGGGGCTA CGCATGGGCA GGCGGGGTAG GGTGAGGTCT  
751 ATGAACAGAA TGGAGCAATG GGCTAACCCG GAGCCTTCAC TCCAAGGCAA  
801 ACCACCCAGC GCACCTGGTG CTGTTGCTTT AAGAACCTGG GCAGATATTG  
851 TAGCTCTGGC TCCAGTCTAA AGCTTCTCTG TACTCTGTTC AATAAAGGGC  
901 TAAGGGGTGG GTGCTGAGGG GTCCCTCTTC CCGCTCTGAT TCCCTGGCTA  
951 GAACCCAGAC ATCTCTGGGC TGGAGTTACA TCCTTACCCG GGCAGCCCAC  
1001 TCTGTCTCCA GAGCCGCTGA CCTGTAACTG TCCTTTCCTC AGACCTCAGC  
1051 CCTTTGTGGG TCCTGCTCCT GTGTGCCAC GTCGTCACTC TCCTGGTCAG  
1101 AGCCACACCT GTCTCGCAGA CCACCACAGC TGCCACTGCC TCAGTTAGAA  
1151 GCACAAAGGA CCCCTGCCCC TCCCAGCCCC CAGTGTTCCC AGCAGCTAAG

图 8

1201 CAGTGTCCAG CATTGGAAGT GACCTGGCCA GAGGTGGAAG TGCCACTGAG  
 1251 TAAGAAGCAC AGTGGTGGAG GGTGGGCTAT GGGCACAGAG GTTCCCAGGG  
 1301 TCGGGTTGAC TCCTGAGCGC CAGTCCCCTT CTGCCCATGT ACCACCAGCT  
 1351 GAGCCAGCTG GGC TGAGCAC GCACCATTCT CCCTCCCCAA CCCAGTGTCA  
 1401 TGGGTGCAGG CTTGGCGCAG CTCCCAAGAT GCTCCCTATC AAATAGGACA  
 1451 GAGAACTCAA GACATAAGTA ATGGTCACAG GACCTCCCAG AGCCTTGGTT  
 1501 GCAGTGGACC CCAAGGCCAG CCCCTCCACC CAGAGCCTGC TGGCCTCTGG  
 1551 CCATCTCAGA GGAGCAGCAG CCATCCAGCA CTGCCTCTGT CACCTGGGCT  
 1601 CCCAAGTCAC CGAGGCTGGG CACTAGAAAA GGTCATCCTG AGGAGACAGG  
 1651 TTCAGAAGAG GATTCATCAC GTGAACCAAG GACCATTCTT CACATTCCCC  
 1701 GTGTTTAGGG CTAGGGCCTC TCGGAGACAA CTGCACTTCT GTAACGGACG  
 1751 TTCCACCTA GGTGGTGTGC AGAGCAGTTC TCTAGGTTCC AGATGCATGG  
 1801 GGA CTGGGGG GAGCTGGCAG AGAGGGCACA GCAGAGCAGG GTAGGGGAAG  
 1851 GGCCTGCTCT TCTGAAGAGC TAACTGCTGC CTGTGTCCCT AGATGGAACG  
 1901 CTGAGCTTAT CCTGTGTGGC CTGCAGCCGC TTCCCCAACT TCAGCATCCT  
 1951 CTA CTGGCTG GGCAATGGTT CCTTCATTGA GCACCTCCCA GGCCGACTGT  
 2001 GGGAGGGGAG CACCAGGTGA GGGTCGCAGC AGCCAGGTGG GTGGGAAGGA  
 2051 AGCETTCTGC GGCCTTCTCA TGACCTTTCC TTCCCTTCCG CTCCAGCCGG  
 2101 GAACGTGGGA GCACAGGTAC GCAGCTGTGC AAGGCCTTGG TGCTGGAGCA  
 2151 GCTGACCCCT GCCCTGCACA GCACCAACTT CTCCTGTGTG CTCGTGGACC  
 2201 CTGAACAGGT TGTCCAGCGT CACGTCGTCC TGGCCCAGCT CTGGGTGAGG  
 2251 AGCCCAAGGA GAGGCCTCCA GGAACAGGAG GAGCTCTGCT TCCATATGTG  
 2301 GGGAGGAAAG GGTGGGCTCT GCCAGAGCAG CCTGTGAACT AATGCCCAGC  
 2351 ATTCCTCAAG GTCAGCCAGA CAAAAAGGAA CTTAGGTCTT GGGCAGAGGA  
 2401 GGTGTAGCCT GGGGCAAAGT GATGAGATGT CCCTCCTTTC CTTGGCCTGA  
 2451 TCCTTGTCTG CCTTCACTTC CCTAGGCTGG GCTGAGGGCA ACCTTGCCCC

图 8A

2501 CCACCCAAGA AGCCCTGCCC TCCAGCCACA GCAGTCCACA GCAGCAGGGT  
2551 TAAGACTCAG CACAGGGCCA GCAGCAGCAC AACCTTGACC AGAGCTTGGG  
2601 TCCTACCTGT CTACCTGGAG TGAACAGTCC CTGACTGCCT GTAGGCTGCG  
2651 TGGATGCGCA ACACACCCCC TCCTTCTCTG CTTTGGGTCC CTTCTCTCAC  
2701 CAAATTCAAA CTCCATTCCC ACCTACCTAG AAAATCACAG CCTCCTTATA  
2751 ATGCCTCCTC CTCCTGCCAT TCTCTCTCCA CCTATCCATT AGCCTTCCTA  
2801 ACGTCCTACT CCTCACACTG CTCTACTGCT CAGAAACCAC CAAGACTGTT  
2851 GATGCCTTAG CTTGCACTC CAGGGCCCTA CCTGCATTTC CCACATGACT  
2901 TTCTGGAAGC CTCCCAACTA TTCTTGCTTT TCCCAGACAG CTCCCCTCC  
2951 CATGTCTCTG CTCATTTAGT CCCGTCTTCC TCACCGCCCC AGCAGGGGAA  
3001 CGCTCAAGCC TGGTTGAAAT GCTGCCTCTT CAGTGAAGTC ATCCTCTTTC  
3051 AGCTCTGGCC GCATTCTGCA GACTTCCTAT CTTCTGTCTG TATGTTTTTT  
3101 TTTTCCCCCT TCACTCTAAT GGACTGTTCC AGGGAAGGGA TGGGGGCAGC  
3151 AGCTGCTTCG GATCCACACT GTATCTGTGT CATCCCCACA TGGGTCTCA  
3201 TAAAGGATTA TTCAATGGAG GCATCCTGAC ATCTGTTTAT TTAGGCTTCA  
3251 GTTCCACTCC CAGGAACCTT GCCTGTCCCA CGAGGGAGTA TGGGAGAGAT  
3301 GGACTGCCAC ACAGAAGCTG AAGACAACAC CTGCTTCAGG GGAACACAGG  
3351 CGCTTGAAAA AGAAAAGAGA GAACAGCCCA TAATGCTCCC CGGGAGCAGA  
3401 GGCCACTAAT GGAGAGTGGG AAGAGCCTGG AAAGATGTGG CCTCAGGAAA  
3451 AGGGATGAGA GAAAGGAGGT GGTATGGAAG ACTCAGCAGG AACAAGGTAG  
3501 GCTTCAAAGA GCCTATATTC CTCTTTTTCC CACACCGATC AAGTCAACTC  
3551 AGTACTCACG GGAGAAAAAT AGACTTTATT TACAAGTAAT AACATTTAGA  
3601 AAAGATCCAT CCCC GGCCCT TAAAAACCTT CCCATCACTC CAAATCCCAC  
3651 CCCAGTGCAA GTCTGGGGAA GGTAGGGTGT GAGCTGCTGC TGAAGGCTGT  
3701 CCCCCAACCC CACTCCTGAG ACACAGGGCC CATCCGTCCT GGGAAAGAGC  
3751 ATCCTCTGGC AGGTGCTCCC ACCAGGTCAG ACCCAGTCCT GGACTTCAAG

图 8B

3801 AGTGAGGGCC CCTGCTGGGC CCAGCCACCA GGACAGCAGG AACCAGGGCC  
 3851 TACTCCTCTT ATGGTCCCTT CTAGATCCAG AGGCTAAGAG GAAGACTGGC  
 3901 CAGGCCCAAG GACCCAGCCA TCAAAACCAG CCTCAAATCT GGTGTGTATG  
 3951 GAGAAGTGAC TTTGCTTTAA GAAAAAAGGA GGCAAGGTAG GGAGAGCGCC  
 4001 CACACTGTCC ATGCTCCAGG CCCCTGGGC CAGCTCCGAG AAGGCGCCAG  
 4051 TGAAGGACCA GGGACCAGGC CAGGGTGCGG GCAGGCATCA CTGTCTCTAG  
 4101 GGGTTTGGCT ACTGTTGGCC TGGGAGCTGA GAGAAGGCAC TGAGAGGGAC  
 4151 AGTAGGCGGA GGACCAGGTG ACGGCAGCAT CGGGGACACA GGTGGGGCCA  
 4201 CTCACTGGTA CTGGCCCTTT AGTGCTTTGC CTGAAAGAGA CACAGTCACA  
 4251 TGGCCAGATG AGAACTTGCG ATACTAGCCT GCACCCACTG GCTGGGAAGA  
 4301 TCTCTCCTG CTCCCACGCC CCTGTCTGGA TCCCCTCCCT TGTGAGCCCC  
 4351 AGGGTTATCA GTTGCTGGCT GTGCCTGAGC AGCTCTGGGT GCTCTCCATG  
 4401 AGAATGGGGC CATCTGTCTT CTCTCCTTGG AGAGGAGCTA CCAGGACAGG  
 4451 GACACCTCTT ACCCCACACC CTCCAGCAGC CTGGCGTGGC CCCATCTTGG  
 4501 ATGCTACTTG GTGGGGCGGT CTGGGGGGTG CCCATGCTCT CATCGGGTTT  
 4551 CCCTCCCCCA TCCTGCCAGT GCCTCTACCT TGCCCTTGGC TCGAGGGGTG  
 4601 GCACCAATGG CGGCAGCAGT GGCGGCGCTG GCTGTGGTGG TGGCAATGCG  
 4651 CGGAGAACGG CGGGTTCCAC TGCGAGTGTT GGGGGAAGCC TTGGACAGGG  
 4701 CCTTCTTTGA GGCTCCCCGC CGCAGAAGGC TGTTCCCTAG CTTCTTGGGT  
 4751 GTGTTGAGGA TGCTGAAGGC CATCGACTGG CGCCGGTCAG CCTGCAAGGA  
 4801 AGGGCTGTCA GACCGGGAGA CCAATGCTG CCTTCCCAGG CCAGCGTGCT  
 4851 GTGCCACGCT GTACCAGCAA GGTCCCGCCA GGGCGTCGCT TCATCCCCCT  
 4901 TCAGCCCCAG CCTCACCTGT TTAGTAGAAG CTGGAGCTGC TTTCTTCTGG  
 4951 GCCTCAGTAG TGCTCTGTTT GCGCCCTTCA TGTCGGTCTC GGGGAGTCAT  
 5001 GGGGCGTGGG AAACAGCTGG TGGCCTTCTT AGACTATGGA GAAGAGGACA  
 5051 GTTAGGCAGA CAGTAGCAAG AGGAGTCACA TCTGAAGCCA GGTGTCTTGT

图 8C

5101 CCTCTCAGAG CTGAGTGGAC CTTGTAAGTC AACGTGCAAC CTGCTCCCCCT  
 5151 TCCCAACTCT GGGCCAGATC CTTCCCTTCC CAACAGTTCC CATCCATGGG  
 5201 TCAGGCCCTT GGAGAGAGGG AAAGAGAGGG GGAAGTGAGG GAAGGAGAGA  
 5251 GAAGGCTCCC TTAGTCCTT GGTGAGCTGG GCCTGACCTG AGCACAGTGC  
 5301 TGGAGTAACA CCCAGGAGCC ACCGCGCCTA CCTCAGGAGT TCCAGGGCCCC  
 5351 TGGTGGGGCT CTAGGGAGAC CCGTTTGCGC TGCTGCCGGG TGGTGATGCC  
 5401 AGTGCCCTCG GCTATCTGGA TTGGCTGCAT GCTGGCTCGG CGCAGGGTCT  
 5451 CTTGGGGGTC TCCAGTTTTT ATCTCCTCAT CTGTGATGGT GCCCAGGCTC  
 5501 AGGGAAGGCT GCATGGGTGG AAGAGGTGGT CAGTGGACCA TAGCTGTATG  
 5551 GAGATGGAGG AGGACCTGGG GCTGTTCCAG AACTCTACAC TCGCCCGACA  
 5601 CTTATGGTCG GGACCCTTCC TGCCTACGAG GTAGAAAGAC ACAAGCCTCC  
 5651 TTTCTGTTC TGCTTTCTAC CTAAGCCCTG GGCAAATGGC ACAAGCAGTG  
 5701 CAGTCCTGAC CAGATTCTC TCTGAGCTCC TGCCTACCCC CAGGGACTTC  
 5751 ACCCCTGAGT GCCCTCCAGC TGTCTGTTCC ACCTGGAACA TGAGAAGGTC  
 5801 ACCCCTTCCC CTCTTCGGCC AGTCAGTGAT CCAGGGCCCT AGTGCTCAGG  
 5851 CTAGATCAGC AGGTGGGATT CCAAGGAAGG GCAGGGATGG GAGGCCCTGC  
 5901 ACAGTGACCC CAGGCCTCAC CCTGGACTCC AGGGATAGCA GGTCTTCAGA  
 5951 TGTGGGGGGC AACTCGATT GCGCTGCTGC AGCTCTGCAA TCGGGTTCCA  
 6001 GTCATCCAGC TGCTCAGGCT CATCCTGGCA AGTGCCCATG TAGAAGCTGT  
 6051 TCCTTCCTGT GGAAGGCAGG GAAGTGGGAA CAAATGAGCC TGGAGTCGGC  
 6101 AGGTCACCTC CTGGCCCTGG CATCTTGCCA GCCTTTGCTG CCACCTACCC  
 6151 CATAAACTTG AAGCCCGGCA CACCAGTCTG ATTCAGTGCC GCAGGTGCAG  
 6201 GAGTACGGCA CACAGACTAT TTCTATCCTA GGGGCTTGCT CACCACCTTC  
 6251 TCCCTGGAGA GGGCAGAAGA GGTCACACGC AGAGACTGCT ACTACATCTT  
 6301 ATTCACCTGC CAAGGCTTGG TGGCCAACAC CCAGAGGAAC AAATTAAGGA  
 6351 CCGGGAATTA ATTCCAGGG GCTCCCTGGT GCCCAAAGGA CAAGAGCTTC

图 8D



6401 CAAGAAGAGT CTGGCCAGCC TGGCCTTTCC AGCAGCCCAT CACCGCCTGA  
 6451 GAAGGGCATG GAGGACTCCC CACAGCTAAG TGTCACAATT GTGCTGGGAA  
 6501 TCCCGGGCCC TTAAGTCTGG CTAAGAGTGC CCCCACACA GCCAGCCCCT  
 6551 AGATGGGCAG GTAAGGAAGG CCCTGAGGCT GCAGGAAGGA GGGGCAAGTG  
 6601 GAGCTGGATG GTAGCAAGGA GGCCAGCCTT GGATTTTAA AAAGCTTTCC  
 6651 TCTTTTCCCT GTGCCACGAT CCACCTTCCA GTCTAATTTT GGGGTATAGT  
 6701 AAGTCCCTGT AGTCCCCTCA CCTGGAGGGG CCCCCTGGA CCCCCGGCC  
 6751 TGGGAACGAC GAGCAGAACT GCGAGTGGTG GGGCGGTAGC CAGGCAAGCT  
 6801 GAGCAGGGCT GAGTTGCCAT AATCGGGAGA ACCCAGGCGA GCTAGAGACT  
 6851 GAGTAGAGGA GGTGGCTCGC AGGCTAGCCT GGAAGCAGG AGCAGACCGC  
 6901 GTGCTGTAGA ACGATGAGTT GCGCTGTCT GGCTCTTCCA CATCTAGCTT  
 6951 CTGGAAGACA GAGTGAATCT GTTGCAGTGT ACAGTCCCTG GCACTGTACA  
 7001 GAAGCTTCCC ATTCCCTTCC GAAGCCCTCA GATCCCACGG CACATCCATG  
 7051 TATTCCCAAC TGCTTTGCAA AGGTCCTTAA AGTGTGTGTC TGCAAGAAAT  
 7101 GGGCCTTGTC GACAGAAGCC CTCACAAGGT GGTGCTGATG TTGTCAAGAC  
 7151 TCTTCTACGC ATTTTTTTCA TGGAGTCTAT TCATAATGCT TTGAGGTAGG  
 7201 GAATGCAGAG TGTTTATCGG CCCATTTTGG AGATGAAGTG CAAAGAAATA  
 7251 AAGTGACTAG CCCCAAATCA CACTGCTAGG AAGTATCAGA GCTGGGGCTA  
 7301 GGCCCCATGT CTCCTGACTA GTCAGGCTCA TCCCACAGCC TCTGCTGTCC  
 7351 CTCAGTCCAA ACTTCCAGGG CCCTTACCAT GTTCCAGAAC TTCCCCAAC  
 7401 TTCTTGGTAG CAGGGGGCAC CCTAAACACA CAGGTCCCCC CTGCTGTACC  
 7451 AGGGGCCCCC TCTCCCTCC TCCCAAACCT CCCCTTCAAG ATGTGGAAAC  
 7501 AAAGGCAAGG GCCTGCAGCC TGTCAGGCAG TCCACTGGGC AGCAACAATG  
 7551 CCTCTCAGCT GCATGGGGCA TGCTGGGAGG CACAGGATGG GCTGCAGCTT  
 7601 CGCCACGTTT TCTCCCTTCA CCCTGCACAG GCTCAGTGCT ACGCATGGAG  
 7651 AGAATGCTAG CCTTAGTCAG GAGGCAGGGA TCTAATCCTA GCCCTGCCTT

图 8E

00-02-13

7701 TTTCTTCAGA AGTGCCCTTA ACCAAGTCAC TGCCCTTTTT AAGACCTCTC

7751 AGCTTTCCCA CTGTAACATG GACTGGCTGC TCATCCCTCC CTGCTCCTGA

7801 CTGAGTGCCC AG

(SEQ ID NO:9)

ACGAGTCTTTT TACTTACCAAGGCTC 图 8F

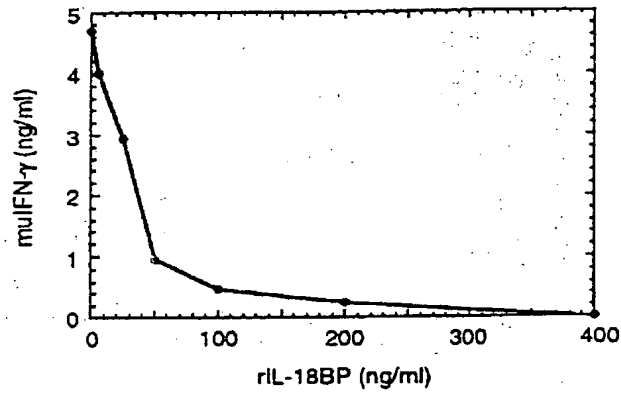


图 9A

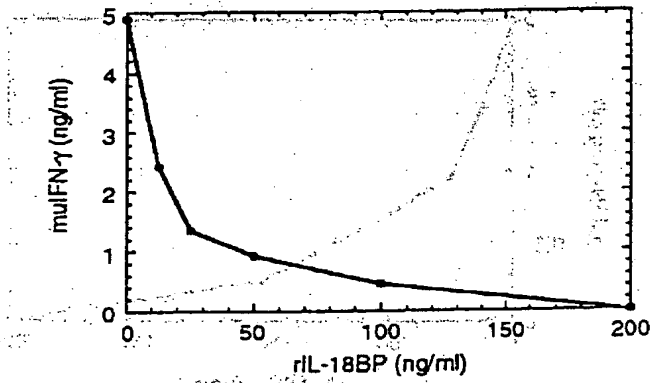


图 9B

00 02 13

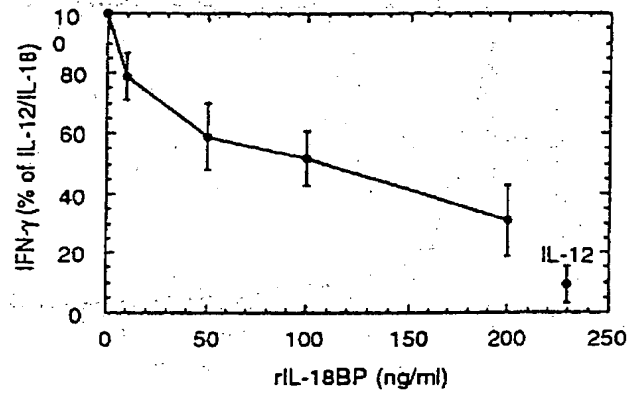


图 9C

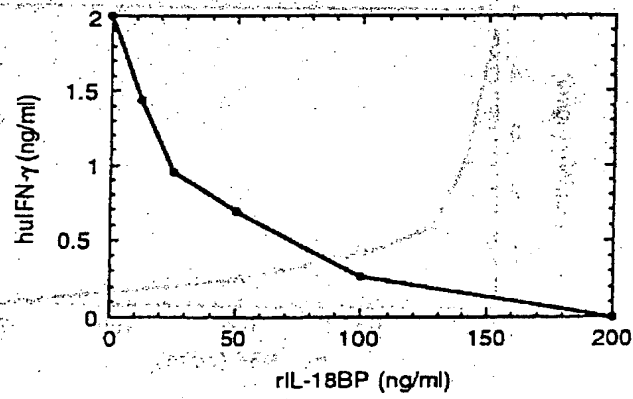


图 9D